

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Humangenetik

Direktor der Einrichtung: Prof. Dr. med. Christian Kubisch

**Das Fragile X Syndrom: Untersuchung des zellulären
Interaktionsmusters der physiologischen und einer pathogenen
FMRP-Variante**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Anna Egbers
aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: & '\$ & '\$ % +**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. S. Kindler

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. E. Mohr

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
1 Einleitung.....	9
1.1 Das Fragile X Syndrom	9
1.1.1 Vererbung.....	10
1.1.2 Phänotypische Merkmale	11
1.2 Das <i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>	12
1.2.1 Domänen.....	12
1.2.2 Zelluläre Lokalisation.....	13
1.2.3 Funktion	14
1.3 Das veränderte Protein FMRP-I304N	16
1.4 Interaktionspartner von FMRP	17
1.5 Therapieoptionen	18
1.6 Arbeitshypothese und Fragestellung	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien.....	21
2.1.2 Nährmedien und Seren.....	21
2.1.3 Bakterienstämme, Zelllinien.....	21
2.1.4 Vektoren.....	22
2.1.5 Kits	22
2.1.6 Antikörper	22
2.1.6.1 Primäre Antikörper	22
2.1.6.2 Sekundäre Antikörper	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1.1 Transformation und Kultivierung von Bakterien.....	25
2.2.1.2 Isolierung der Plasmid-DNA.....	25
2.2.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	25
2.2.1.4 Agarosegel	26
2.2.2 Zellbiologische Methoden	26
2.2.2.1 Zellkultur und Transfektion der HEK-Zellen.....	26
2.2.2.2 Immunzytochemie.....	27
2.2.2.3 Mikroskopie.....	27
2.2.3 Proteinchemische Methoden	27

2.2.3.1	Proteingewinnung mittels Affinitätschromatographie	27
2.2.3.2	Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	29
2.2.3.3	Proteintransfer mittels <i>Western Blot</i>	29
2.2.3.4	Immunologische Proteindetektion	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	FMRP (<i>fragile X-mental retardation protein</i>)	32
3.2	DDX1 (<i>DEAD box protein 1</i>).....	35
3.3	EF1alpha (<i>Elongation factor 1 alpha</i>)	38
3.4	NONO (<i>Non-POU domain-containing octamer-binding protein</i>).....	40
3.5	PRKDC (<i>Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Polypeptide</i>)	42
3.6	RPS6 (<i>40S ribosomal protein S6</i>).....	44
3.7	ILF3 (<i>Interleukin enhancer-binding factor 3</i>)	46
3.8	hnRNP-H und hnRNP M1-M4 (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>)	49
3.9	PCBP1 und PCBP2 (<i>Poly(rC)-binding protein</i>)	53
4	Diskussion	59
5	Zusammenfassung	68
6	Abkürzungsverzeichnis	71
7	Literaturverzeichnis.....	74
8	Danksagung	85
9	Lebenslauf	86
10	Eidesstattliche Versicherung	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Exon 1 und flankierender Bereiche des <i>FMR1</i> -Gens	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Proteins FMRP und seiner funktionellen Domänen.....	13
Abbildung 3: Vereinfachtes Schema der Funktion von FMRP in Neuronen.....	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Proteins FMRP-I304N.....	17
Abbildung 5: Expression von EGFP-FMRP- und EGFP-FMRP-I304N-Fusionsproteinen in HEK 293-Zellen	32
Abbildung 6: Subzelluläre Verteilung von FMRP in kultivierten Hippokampusneuronen der Ratte.....	34
Abbildung 7: Nachweis von endogenem DDX1 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)	36
Abbildung 8: Zelluläre Verteilung von DDX1 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte).....	37
Abbildung 9: Nachweis von endogenem EF1alpha in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)	38
Abbildung 10: Zelluläre Verteilung von EF1alpha und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte).....	39
Abbildung 11: Nachweis von endogenem NONO in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)	40
Abbildung 12: Zelluläre Verteilung von NONO und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte).....	41
Abbildung 13: Nachweis von endogenem PRKDC in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)	42
Abbildung 14: Zelluläre Verteilung von PRKDC und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte).....	43
Abbildung 15: Nachweis von endogenem RPS6 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)	44
Abbildung 16: Zelluläre Verteilung von RPS6 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte).....	45
Abbildung 17: Nachweis von endogenem ILF3 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)	46
Abbildung 18: Zelluläre Verteilung von ILF3 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte).....	48

Abbildung 19: Nachweis von endogenem hnRNP-H in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B).....	49
Abbildung 20: Nachweis von endogenem hnRNP M1-M4 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B).....	50
Abbildung 21: Zelluläre Verteilung von hnRNP-H und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte).....	51
Abbildung 22: Zelluläre Verteilung von hnRNP M1-M4 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte).....	52
Abbildung 23A und B (B: verlängerte Belichtungszeit): Nachweis von endogenem PCBP1 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor bzw. nach Affinitätschromatographie	53
Abbildung 24A und B (B: verlängerte Belichtungszeit): Nachweis von endogenem PCBP2 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor bzw. nach Affinitätschromatographie	54
Abbildung 25: Zelluläre Verteilung von PCBP1 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte).....	55
Abbildung 26: Zelluläre Verteilung von PCBP2 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte).....	56
Abbildung 27: Einteilung der Interaktionspartner von FMRP nach ihrer molekularen Funktionsweise.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien	21
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Vektoren	22
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Kits	22
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper	22
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper.....	24
Tabelle 6: Ergebnisse <i>Western Blot</i> nach Affinitätschromatographie transfektierter HEK-Zellen.....	57
Tabelle 7: Ergebnisse Immunzytochemie an kultivierten Hippocampusneuronen der Ratte	58

1 Einleitung

1.1 Das Fragile X Syndrom

Das Fragile X Syndrom wurde erstmals 1943 von Martin und Bell beschrieben (Martin and Bell, 1943). Es ist eine der häufigsten genetischen Ursachen für eine intellektuelle Beeinträchtigung. Die Prävalenz variiert in verschiedenen Studien und liegt bei ca. 1:7143 Männern und bei ca. 1:11111 Frauen bezogen auf die Allgemeinbevölkerung (Hunter et al., 2014). Der Name rührt von der Beobachtung her, dass sich bei betroffenen Individuen in der zytogenetischen Untersuchung ein atypisch kondensiertes X-Chromosom zeigt. Die distalen langen Enden des X-Chromosoms weisen eine fragil erscheinende Region auf (Lubs, 1969). Diese Beobachtung lässt sich in folatfreiem Zellkulturmedium machen, da es unter diesen Bedingungen zu einer unvollständigen Kondensation des Chromosoms während der Metaphase (der Mitose) kommt (Sutherland, 1977). Die betroffene Region umfasst die Bande Xq27.3 (Harrison et al., 1983) und beinhaltet das Gen *FMR1* (*fragile X linked mental retardation type 1*) (Verkerk et al., 1991). *FMR1* ist ein 38 kb großes Gen, das aus 17 Exons besteht und ein 4,4 kb großes Transkript kodiert (Eichler et al., 1993). Im Exon 1 befindet sich vor dem kodierenden Bereich eine repetitive Region aus sich wiederholenden CGG-Trinukleotid-Elementen. Bei Gesunden umfasst diese Sequenz 6 bis 54 Triplettwiederholungen. Wiederholungen von 52 bis 200 CGG-Triplets werden als Prämutation bezeichnet. Diese Prämutationen konnten bei phänotypisch gesunden Männern und weiblichen Trägerinnen aus Familien, die vom Fragilen X Syndrom betroffen sind, gefunden werden. Bei Vollmutationen mit Expansionen von über 200 Triplets kommt es zur Ausprägung des Fragilen X Syndroms (Fu et al., 1991). Das Fragile X Syndrom gehört somit in die Gruppe der Trinukleotidexpansionserkrankungen, zu denen auch die Chorea Huntington, verschiedene spinocerebelläre Ataxien und die Myotone Dystrophie zählen. Die Tripletterweiterung führt zu einer Methylierung der Cytosinreste in der repetitiven Region und angrenzenden DNA-Abschnitten einschließlich der Promotorregion. Die Methylierung inhibiert die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren und es kommt zu einer Inaktivierung des Gens (Pieretti et al., 1991, Sutcliffe et al., 1992, Schwemmle et al., 1997). Das Genprodukt FMRP (*fragile X mental retardation*

protein) wird folglich nicht mehr gebildet (Sutcliffe et al., 1992) und steht den betroffenen Zellen nicht zur Verfügung.

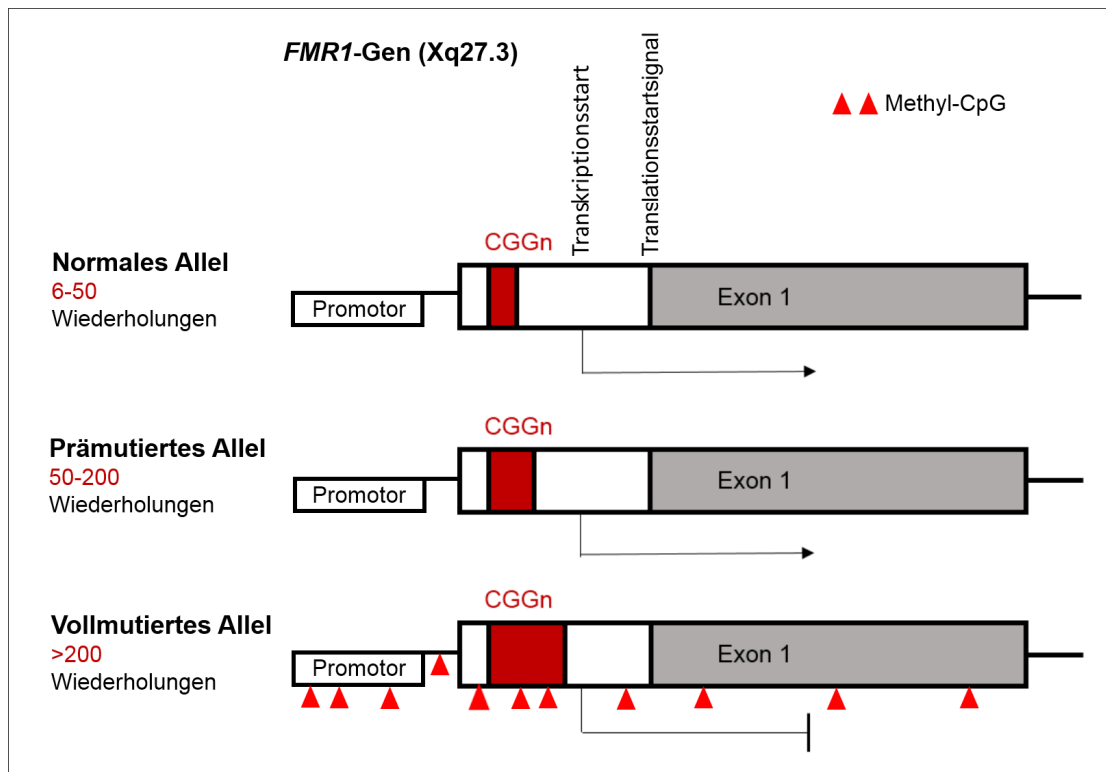


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Exon 1 und flankierender Bereiche des *FMR1*-Gens.

Im Exon 1 (Rechteck) vor dem kodierenden Bereich (grau) befinden sich Wiederholungen des CGG-Triplets (rot). Abhängig von der Anzahl der Wiederholungen werden drei verschiedene Allel-Kategorien unterschieden (normales Allel, prämutiertes Allel und vollmutiertes Allel). In der Normalpopulation und bei Trägern der Prämutation ist das Gen nicht methyliert und die Transkription kann erfolgen (Pfeil). Ein vollmutiertes Allel führt zu einer Methylierung der CpG-Inseln (rote Dreiecke) im Bereich der repetitiven Sequenz, in den angrenzenden Regionen und im Bereich des Promotors. Hierdurch wird die Transkription verhindert und es kommt zur Ausprägung des Phänotyps des Fragilen X Syndroms. Frei modifiziert nach Garber (Garber et al., 2008). Weitere Erklärung siehe Text.

1.1.1 Vererbung

Die Vererbung des Fragilen X Syndroms folgt dem X-chromosomalen Erbgang, weist jedoch einige Besonderheiten auf. Es liegt eine unvollständige Penetranz vor und sowohl Männer als auch Frauen können erkranken (Sherman et al., 1984,

Sherman et al., 1985). In der Regel erkranken Töchter von gesunden männlichen Prämutationsträgern nicht. Allerdings haben die Söhne dieser Töchter (also die männlichen Enkel des gesunden Prämutationsträgers) ein hohes Risiko zu erkranken. Die männlichen Prämutationsträger selber und ihre Söhne sind jedoch gesund (Sherman et al., 1984, Sherman et al., 1985). Diese Besonderheit wird auch als Sherman-Paradox bezeichnet. Folgende Tatsachen können diese Beobachtung erklären: Prämutierte Allele (52 bis 200 Triplettwiederholungen) neigen im Gegensatz zu normalen Allelen (6 bis 52 Triplettwiederholungen) in der weiblichen Meiose zur Expansion des repetitiven Bereichs. Weibliche Trägerinnen der Prämutation vererben folglich häufig Allele mit erhöhter Anzahl der Triplettwiederholungen an ihre Nachkommen (Pembrey et al., 1985, Fu et al., 1991, Oberle et al., 1991). Die Länge der repetitiven Region nimmt mit jeder Folgegeneration zu, was auch als Antizipation bezeichnet wird. Einem vollmutierten Allel (Triplettextension > 200) ist also immer ein prämutiertes Allel in einer vorherigen Generation vorausgegangen (Fu et al., 1991).

1.1.2 Phänotypische Merkmale

In der Ausprägung der phänotypischen Besonderheiten bei Erkrankten zeigt sich eine große Variabilität. Interessant ist, dass auch Frauen betroffen sind. Die Symptome bei weiblichen Trägerinnen der Vollmutation, insbesondere die Intelligenzminderung, sind jedoch häufig milder ausgeprägt oder gar nicht vorhanden (Reiss et al., 1995, Rousseau et al., 1991). Betroffene Frauen besitzen in der Regel in jeder Körperzelle ein gesundes und ein mutiertes X-Chromosom. Eines dieser Chromosomen wird jeweils zufällig inaktiviert. Das so entstandene individuelle Zellmosaik ist verantwortlich für das Ausmaß des Ausprägungsgrades der Erkrankung (Kirchgessner et al., 1995, Reiss et al., 1995).

Das Hauptsymptom des Fragilen X Syndroms ist die Intelligenzminderung. Die Ausprägung ist sehr variabel und reicht von einem sehr niedrigen IQ mit ausgeprägter Retardierung bis zu nur minimaler kognitiver Beeinträchtigung. Interessant ist, dass mit zunehmendem Alter der IQ-Wert bei erkrankten Personen weiter abnimmt (Wright-Talamante et al., 1996). Typisch sind ebenfalls Sprach- und Sprechstörungen sowie ein allgemein schlechtes Sprachverständnis (Price et al., 2007). Kinder mit Fragilem X Syndrom neigen zu psychosozialen

Auffälligkeiten wie Aufmerksamkeitsdefiziten, hyperkinetischem Verhalten und stereotypen Bewegungsmustern (Baumgardner et al., 1995). Auch emotionale Auffälligkeiten, wie ausgeprägte Schüchternheit und Vermeidung von Augenkontakt wurden beobachtet (Einfeld et al., 1994).

Patienten mit Fragilem X Syndrom zeigen zusätzlich somatische Merkmale, deren Auftreten nicht obligat ist, und die häufig erst mit zunehmendem Alter in Erscheinung treten. Hierzu zählen eine relative Makrozephalie, ein längliches Gesicht, große abstehende Ohren, ein im Kindesalter auffälliger Großwuchs sowie in ca. 80% der Fälle eine deutliche Hodenvergrößerung (Turner et al., 1980, de Vries et al., 1995, Heulens et al., 2013). Zusätzlich können kardiale Auffälligkeiten wie ein Mitralklappenprolaps oder eine Dilatation der Aortenwurzel auftreten, sowie eine vermehrte Überstreckbarkeit der Fingergelenke, Plattfüße und ein hoher Gaumen, die die Vermutung nahe legen, dass eine allgemeine Bindegewebsschwäche vorliegt (Hagerman et al., 1984, Sreeram et al., 1989).

1.2 Das *Fragile X Mental Retardation Protein*

Bei Patienten mit Fragilem X Syndrom wird, wie bereits erwähnt, die Genexpression von *FMR1* durch Methylierung der Promotorregion unterdrückt. Dies führt zu einem Fehlen des Genproduktes FMRP in den betroffenen Zellen. FMRP ist ein 70-80 kDa großes RNA-bindendes Protein (Devys et al., 1993). Es weist eine große spezieübergreifende Konservierung auf, was für eine elementare Bedeutung des Proteins spricht (Ashley et al., 1993b, Siomi et al., 1995, Price et al., 1996). Es wurden mehrere Isoformen des Proteins gefunden, die durch alternatives Spleißen der entsprechenden prä-mRNA entstehen (Verkerk et al., 1993).

1.2.1 Domänen

Die Binnenstruktur von FMRP beinhaltet einige funktionelle Motive, die wichtige Hinweise bezüglich der Proteinbindungsfähigkeit und der subzellulären Lokalisation liefern. So besitzt FMRP zwei hnRNP K homologe (KH)-Domänen und eine arginin- und glycinreiche RGG-Box, die charakteristische Motive von RNA-bindenden Proteinen sind (Ashley et al., 1993a, Siomi et al., 1993). Es

konnte gezeigt werden, dass die RGG-Box tatsächlich RNA-Bindungsaktivität besitzt (Kiledjian and Dreyfuss, 1992). Das N-terminale Ende des Proteins beinhaltet zwei Tudor (TD)-Domänen, die vermutlich ebenfalls zur RNA- und Proteinbindung fähig sind und über die u.a. auch die Homo- und Heterodimerisierung von FMRP zu erfolgen scheint (Adinolfi et al., 2003, Ramos et al., 2006). Es wurden ein NLS (*nuclear localization signal*) und ein NES (*nuclear export signal*) identifiziert, die vermuten lassen, dass sich FMRP zwischen Nucleus und Zytoplasma hin und her bewegt (Eberhart et al., 1996, Sittler et al., 1996). Eine Isoform des FMRP besitzt die NES-Domäne nicht und ist nur im Nucleus zu finden (Sittler et al., 1996).

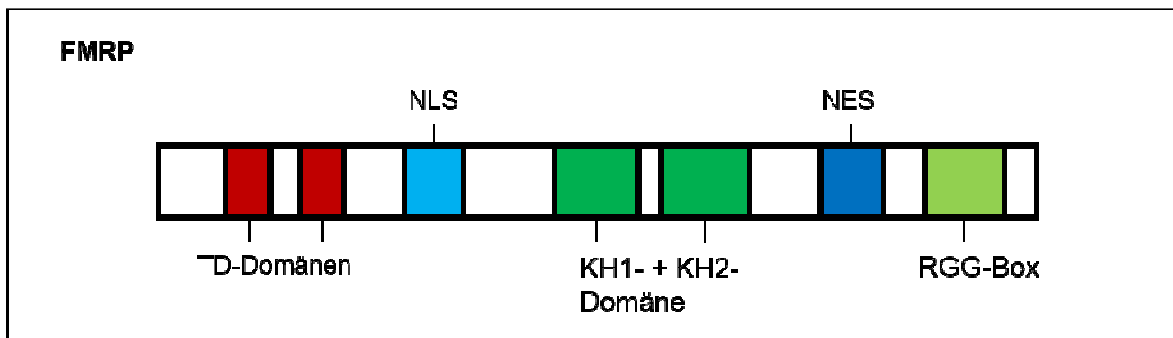


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Proteins FMRP und seiner funktionellen Domänen.

Dargestellt sind die RNA-bindenden Regionen KH1, KH2, die RGG-Box und die TD (Tudor)-Domänen, die zusätzlich Proteinbindungsfähigkeit besitzen, sowie die Transportmotive NLS und NES. Modifiziert nach Fernandez (Fernandez et al., 2013).

1.2.2 Zelluläre Lokalisation

FMRP wird ubiquitär in embryonalem murinem Gewebe exprimiert (Hinds et al., 1993, Khandjian et al., 1995). Die höchste Konzentration von FMRP in adulten murinen und humanen Zellen findet sich jedoch im Gehirn und in den Hoden (Hinds et al., 1993). Dies ist besonders interessant, da diese beiden Organe in der Pathologie des Fragilen X Syndroms eine wichtige Rolle spielen (mentale Retardierung und Makroorchie). Lu et al. (Lu et al., 2004) konnten zeigen, dass gerade das neonatale Gehirn eine besonders hohe Proteinkonzentration aufweist, die im weiteren Verlauf der Entwicklung wieder abnimmt, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass FMRP für die neuronale Entwicklung von entscheidender

Bedeutung ist. Im Gehirn wird FMRP am stärksten im Hippokampus und im Kleinhirn exprimiert (Hinds et al., 1993, Feng et al., 1997b), wobei es hauptsächlich in Neuronen und kaum in Gliazellen gebildet wird (Devys et al., 1993). Untersuchungen zur neuronalen subzellulären Lokalisation von FMRP zeigten eine deutliche Detektion im Zytosol des Zellkörpers und in den Dendriten, insbesondere in ribosomenreichen Regionen (Devys et al., 1993, Tamanini et al., 1997, Feng et al., 1997b). Es konnte aber auch im Zellkern (Feng et al., 1997b) nachgewiesen werden.

1.2.3 Funktion

FMRP bildet große zytoplasmatische Ribonukleoproteinkomplexe (RNP-Komplexe), die mehrere Proteine und RNAs beinhalten (Bagni et al., 2012). Es wurde auch in *p-bodies* und Stress-Granula gefunden, in denen die Translation von mRNAs blockiert wird (Zalfa et al., 2006).

Die genaue zelluläre Funktion von FMRP ist bisher nicht geklärt, es existieren jedoch zahlreiche Hypothesen. Es wird vermutet, dass FMRP den subzellulären Transport, die Stabilität und die Translation von neuronalen mRNAs reguliert und dass die kodierten Proteine für die Struktur und Funktion von Synapsen bedeutend sind (Bagni et al., 2012). Folgende Beobachtungen stützen diese Vermutung: Der Transport von mRNAs, gebunden an FMRP-haltige Granula, erfolgt vom Zellkern in das Zytoplasma und weiter in die Dendriten in dynamischer Assoziation an mikrotubuläre Strukturen (Kanai et al., 2004, Antar et al., 2005, Ferrari et al., 2007). Die Stabilisierung von mRNA durch FMRP erfolgt z.B. über eine Verhinderung des Abbaus. Nach Behandlung kultivierter Neurone mit einem Transkriptionsblocker konnten weiterhin spezifische mRNAs nachgewiesen werden, während in FMRP-defizienten Zellen keine entsprechenden mRNAs mehr detektiert werden konnten (Zalfa et al., 2007). Die Regulation der Translation erfolgt schließlich über vielfältige Mechanismen, u.a. indem FMRP als Repressor fungiert (Laggerbauer et al., 2001).

Huber et al. (Huber et al., 2002) fanden 2002 in einem *FMR1*-Knockout-Mausmodell einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Phänotyp des Fragilen X Syndroms und metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) und legten damit den Grundstein für die sogenannte mGluR-Theorie. mGluR-Rezeptoren sind

ein Bestandteil postsynaptischer Zellmembranen und haben einen Einfluss auf die neuronale Plastizität (Huber et al., 2000, Snyder et al., 2001), die die Grundlage für Lernen und Gedächtnisleistung bildet (Martin et al., 2000). Die langfristige Modifikation der Funktion von Synapsen erfolgt mittels *long-term potentiation* (LTP, Langzeitpotenzierung) und *long-term depression* (LTD, Langzeitunterdrückung) (Bear and Malenka, 1994). Die mGluR-Rezeptoren beeinflussen die LTD, indem sie die Translation postsynaptischer mRNAs regulieren (meist stimulieren) und die Internalisierung von AMPA-Rezeptoren an der Zelloberfläche vermitteln (Huber et al., 2000, Snyder et al., 2001). FMRP wirkt als negativer Regulator der Translation und somit als Gegenspieler der mGluR-Rezeptoren. Es unterdrückt die Translation postsynaptischer mRNAs. In Abwesenheit von FMRP kommt es vermutlich zu einer verstärkten Proteinsynthese, deren Folge u.a. eine Änderung der neuronalen Plastizität ist (Bear et al., 2004). Morphologisch ist dies sichtbar an einer Verlängerung dendritischer Dornen in den Neuronen (Vanderklisch and Edelman, 2002). Bear et al. (Bear et al., 2004) postulieren somit als Ursache für die Symptomatik des Fragilen X Syndroms eine Verstärkung der regulären Wirkungen der mGluR in Abwesenheit von FMRP.

Somit lässt sich zusammenfassend folgendes vereinfachtes Modell der zellulären Wirkweise von FMRP erstellen (Bagni and Greenough, 2005) (siehe Abbildung 3): FMRP gelangt in den Zellkern und interagiert dort mit anderen nukleären Proteinen (z.B. mit FXR1 und 2 (*fragile x related protein 1 und 2*)) sowie mit mRNAs. Es formt sich ein RNP-Komplex, mit dem spezifische mRNA-Moleküle aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert werden. Im Zytoplasma interagieren FMRP und seine nukleären Partner dann mit zytoplasmaspezifischen Proteinen (wie z.B. CYFIP1 (*cytoplasmic FMRP-interacting protein 1*)). Der entstandene Komplex bewegt sich entlang der Dendriten zu den Synapsen und transportiert dabei assoziierte RNA-Moleküle. An den Synapsen erfolgt dann eine aktivitätsabhängige Proteinsynthese im Zusammenspiel mit den mGluR-Rezeptoren (Bear et al., 2004).

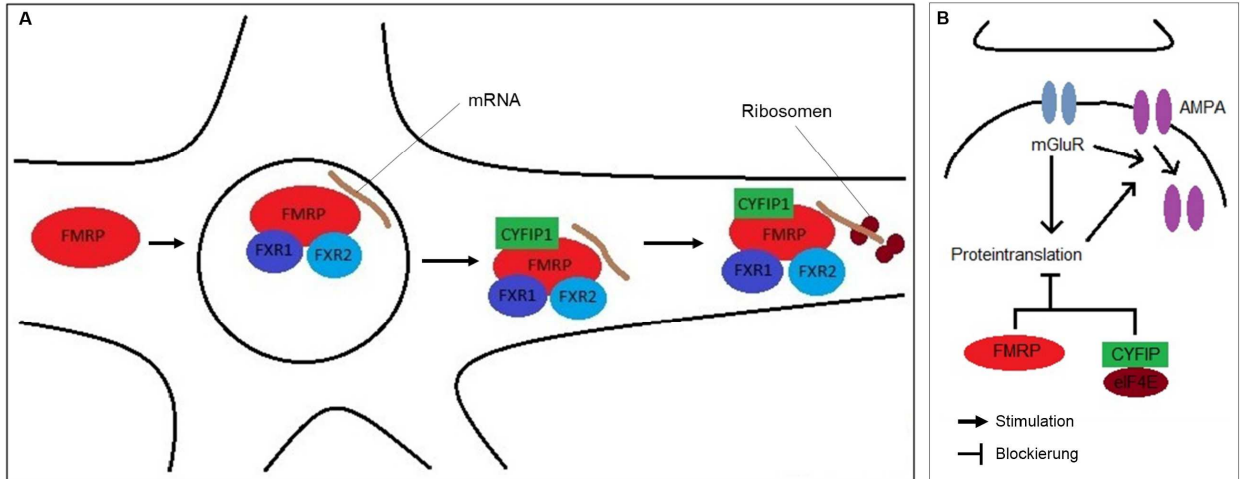


Abbildung 3: Vereinfachtes Schema der Funktion von FMRP in Neuronen.

A: FMRP gelangt in den Zellkern, bildet dort RNPs, indem es an nukleäre Proteine wie FXR1 und 2 sowie an mRNA bindet. Es erfolgt der Transport ins Zytosol und die Weiterleitung entlang der Dendriten zu den Synapsen, wo die Proteinbiosynthese mit Hilfe der Ribosomen erfolgt. **B:** Dargestellt ist das Zusammenspiel von FMRP und mGluR. Durch FMRP kommt es zu einer Blockierung der Proteintranslation unter Mitwirken von CYFIP1 und eIF4E (siehe auch 1.4). Aktive mGluR und eine verstärkte Proteinsynthese führen zu einer Internalisierung der AMPA-Rezeptoren. Frei modifiziert nach (Bagni and Greenough, 2005, Bagni et al., 2012, Bear et al., 2004). Weitere Erläuterungen siehe Text.

1.3 Das veränderte Protein FMRP-I304N

De Boule veröffentlichte 1993 eine interessante Beobachtung zu einem besonderen Patientenfall. Ein männlicher Patient mit schwerer intellektueller Beeinträchtigung, einem IQ von 20 und keiner Sprachfähigkeit wurde auf das Vorliegen eines Fragilen X Syndroms untersucht. Zusätzliche Merkmale, die für das Vorliegen dieser Erkrankung sprachen, waren faziale Auffälligkeiten wie ein längliches asymmetrisches Gesicht, eine große Stirn, große Ohren, dicke Lippen und ein hervorstehendes Kinn. Es lag eine ausgeprägte Makroorchie vor. In der zytogenetischen Untersuchung konnte keine fragile Stelle am X-Chromosom nachgewiesen werden, es fanden sich eine normale CGG-Wiederholungsfrequenz und unmethylierte CpG-Inseln. Als einzige genetische Auffälligkeit zeigte sich eine Punktmutation T zu A im *FMR1*-Gen, die in FMRP zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Asparagin an Position 304 führt (De Boule et al., 1993).

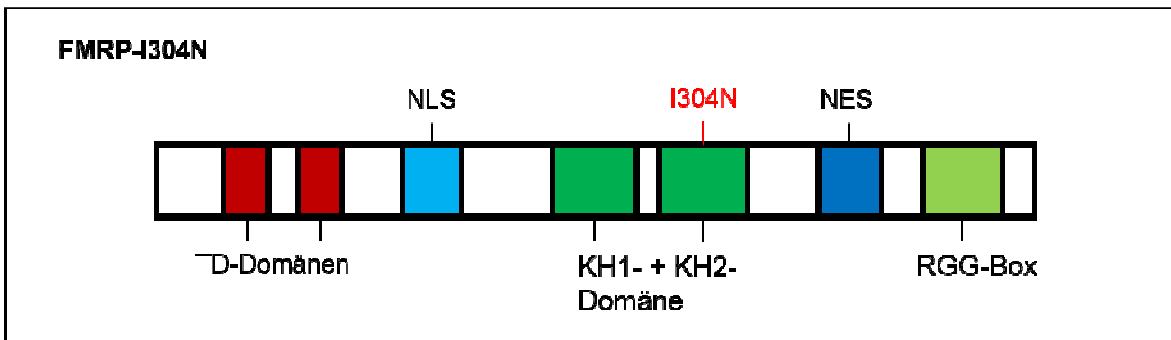


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Proteins FMRP-I304N.

Durch die Punktmutation T zu A im *FMR1*-Gen kommt es in der KH2-Domäne des Proteins an Position 304 zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Asparagin (I304N). Modifiziert nach Fernandez (Fernandez et al., 2013).

Die Aminosäureaustausch I304N verändert eine der am stärksten konservierten Regionen des KH2-Motivs (Siomi et al., 1993). Die Beobachtung, dass dieser hochkonservierte Bereich der KH-Domäne für eine normale Proteinfunktion notwendig ist und seine Veränderung zum selben Phänotyp wie ein kompletter Ausfall des Proteins führt (Gedeon et al., 1992, Wohrle et al., 1992), unterstützt die Ansicht, dass die KH-Domänen von funktioneller Bedeutung sind (Siomi et al., 1993). Durch die Veränderung kommt es zu einer Destabilisierung der Sekundärstruktur im Bereich der KH2-Domäne, was zu einer Veränderung ihrer Bindungsfähigkeit führt (Musco et al., 1996, Di Marino et al., 2014). So ist die RNA-Bindungsfähigkeit beeinträchtigt (Siomi et al., 1994), die Assoziation von FMRP mit Ribosomen wird aufgehoben (Feng et al., 1997a, Darnell et al., 2005) und es kommt zu einer Bildung ungewöhnlicher mRNP-Komplexe (Feng et al., 1997a). Lagerbauer et al. (Lagerbauer et al., 2001) konnten zeigen, dass zusätzlich die Fähigkeit des veränderten Proteins zur Homodimerisierung gestört ist.

1.4 Interaktionspartner von FMRP

Es ist bekannt, dass FMRP mit verschiedenen zytoplasmatischen und nukleären Proteinen, die in den mRNA-Metabolismus und die Bildung des Zytoskeletts involviert sind, interagiert (Fernandez et al., 2013). Als bisher identifizierte und gut untersuchte Proteine sind u.a. zu nennen: Die Homologen FXR1 und 2 (*fragile x*

related protein 1 und 2) (Siomi et al., 1995, Zhang et al., 1995), TDRD3 (*tudor domain containing protein 3*) (Linder et al., 2008), NUFIP1 (*nuclear FMRP-interacting protein*) (Bardoni et al., 2003) und CYFIP1 (*cytoplasmic FMRP-interacting protein 1*) (Schenck et al., 2001, Napoli et al., 2008, De Rubeis et al., 2013). Durch Identifizierung dieser Interaktionspartner konnte bereits ein besseres Verständnis der molekularen Funktion von FMRP erlangt werden (siehe auch Abbildung 3). So konnten z.B. Napoli et al. (Napoli et al., 2008) zeigen, dass die Interaktion von FMRP mit CYFIP1 und dem Translationsinitiationsfaktor eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) zu einer Unterdrückung der Translation assoziierter mRNAs führt. Die Entdeckung von TDRD3 als Interaktionspartner, ein Protein, das in Stress-Granula zu finden ist, ist insofern interessant, als dass es über die KH2-Domäne mit FMRP in Verbindung tritt. Es konnte gezeigt werden, dass es zu keiner Interaktion kommt, wenn FMRP die oben genannte Veränderung I304N aufweist (Linder et al., 2008).

1.5 Therapieoptionen

Neben kognitiven und verhaltensmodulierenden Therapieansätzen sowie bildungsfördernden Impulsen steht die medikamentöse Therapie des Fragilen X Syndroms im Zentrum des Forschungsinteresses. Aktuelle medikamentöse Therapieansätze beziehen sich auf zwei mögliche Wege: Zum einen wird eine Reaktivierung des betroffenen Gens, zum anderen eine Kompensierung des Verlusts von FMRP verfolgt (Bagni et al., 2012).

Ansätze die eine Reaktivierung von *FMR1* verfolgen sind *in vitro* in lymphoblastoiden Zellen erfolgreich, wegen vermuteter starker Nebenwirkungen bisher aber nicht *in vivo* einsetzbar (Bagni et al., 2012, Chiurazzi et al., 1998) oder zeigten in kultivierten lymphoblastoiden Zellen keinen Benefit (Tabolacci et al., 2008).

Ein positiver Effekt konnte durch die Behandlung mit Acetyl-L-Carnitin erzielt werden. Es zeigte sich eine signifikante Besserung von Hyperaktivität und adaptivem Verhalten bei behandelten Kindern (Torrioli et al., 2008). Der Methylierungsstatus und die Genexpression des *FMR1*-Gens änderte sich jedoch nicht (Torrioli et al., 2008).

Ansätze zur Kompensation des Verlustes von FMRP sind folgende (Bagni et al., 2012):

- Es wurden verschiedene Medikamente zur Beeinflussung des glutamatergen Systems getestet, von denen eines im Mausmodell zunächst sehr vielversprechend war (Michalon et al., 2012), die beim Menschen letztendlich jedoch keinen positiven Effekt zeigten (Berry-Kravis et al., 2006, Scharf et al., 2015).
- Eine Studie an Kindern und Jugendlichen mit einem GABA-Rezeptor-Aktivator (Ganaxolone), läuft aktuell noch (Hagerman and Ceulemans, 2016). Es wird vermutet, dass durch den Verlust von FMRP auch das GABA-Rezeptorsystem beeinflusst wird, indem es zu einer Destabilisierung von mRNAs kommt, die GABA-Rezeptoruntereinheiten kodieren (D'Hulst et al., 2006).
- Aktuell vielversprechend ist eine Therapie mit dem Breitspektrumantibiotikum Minocyclin, das in klinischen Studien eine Verhaltensverbesserung zeigte (Paribello et al., 2010, Leigh et al., 2013). Bekannt ist, dass es die intrazelluläre Konzentration des Proteins MMP9 (*matrix metalloproteinase 9*), das in Abwesenheit von FMRP verstärkt synthetisiert wird, vermindert (Dziembowska et al., 2013). Inwiefern dies zur beobachteten Verhaltensverbesserung führt ist noch unklar.

Im Hinblick auf diese Ergebnisse scheinen Therapieansätze vielversprechend, die die durch den Verlust von FMRP hervorgerufene Pathologie direkt auf molekularer Ebene beheben. Hierfür ist jedoch ein genaues Verständnis der molekularen Wirkweise von FMRP notwendig, das vermutlich durch weitere Grundlagenforschung erlangt werden kann.

1.6 Arbeitshypothese und Fragestellung

Trotz zahlreicher Untersuchungen ist die molekulare Wirkweise von FMRP noch nicht ausreichend entschlüsselt, um Patienten mit dem Fragilen X Syndrom eine ausreichende Behandlung zukommen lassen zu können. Ziel dieser Arbeit ist es, weitere mögliche zelluläre Interaktionspartner von FMRP zu identifizieren, um ein besseres Verständnis für die molekulare Wirkweise von FMRP in Zellen zu

erlangen. Hierfür sollen Fusionsproteine aus FMRP und EGFP mittels Affinitätschromatographie aus humanen Zellen isoliert und die gebundenen Interaktionspartner mittels *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern charakterisiert werden. Es soll eine Betrachtung des Bindungsmusters der Proteine mit FMRP und eine vergleichende Analyse der Interaktion mit dem veränderten Fusionsprotein FMRP-I304N-EGFP erfolgen. Sollten sich Proteine finden lassen, die gegenüber FMRP und FMRP-I304N ein verändertes Interaktionsmuster zeigen, könnte dies Rückschlüsse auf den Pathomechanismus des Fragilen X Syndroms zulassen. Des Weiteren soll mittels Immunzytochemie die subzelluläre Lokalisation der Interaktionspartner in Hippokampusneuronen der Ratte verifiziert werden, um den möglichen Ort einer Interaktion zwischen FMRP und den untersuchten Proteinen weiter eingrenzen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Hersteller der verwendeten Chemikalien sind, soweit nicht anders vermerkt, die Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Penzberg, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Es wurde die höchstmögliche Reinheit und Qualität bezogen.

2.1.2 Nährmedien und Seren

- LB (*lysogeny broth*)-Medium (1% Triptone, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,4)
- DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium (high glucose)*)-Kulturmedium (Thermo Fisher Scientific)
- 10% fetales Kälberserum (*fetal bovine serum (FBS)*, hitzeinaktiviert, PAA Laboratories)
- 10% Ziegen Serum in PBS (*normal goat serum*, Thermo Fisher Scientific)

2.1.3 Bakterienstämme, Zelllinien

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien

	Name	Hersteller
Bakterienstämme	Escherichia coli XL-1 Blue	Stratagene California, La Jolla, USA
Zelllinien	HEK-293 <i>human embryonic kidney cells</i>	European Collection of Cell Cultures
	Hippocampusneurone <i>Rattus norvegicus</i>	AG Kindler, Tiere aus zentraler Tierhaltung, UKE Hamburg

2.1.4 Vektoren

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Vektoren

Eukaryotische Expressionsvektoren	Hersteller	Verwendungszweck
pEGFP-FMRP	AG Rob Willemsen Dep. Of Clinical Genetics, Erasmus University, Rotterdam, Niederlande	Expression des Fusionsproteins aus dem humanen FMRP und C-terminalem grün-fluoreszierendem Protein EGFP (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
pEGFP-FMRP-I304N	AG Rob Willemsen Dep. Of Clinical Genetics, Erasmus University, Rotterdam, Niederlande	Expression des Fusionsproteins aus FMRP mit Aminosäureaustausch I304N und C-terminalem grün-fluoreszierendem Protein EGFP
pEGFP-N1	Clontech Laboratories Inc., USA	Expression des grün-fluoreszierenden Proteins EGFP

2.1.5 Kits

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Kits

Name	Hersteller
<i>NucleoBond Xtra Maxi EF Kit</i>	Macherey-Nagel GmbH, Düren

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper

Antigen/ Antikörper/ Spezies	Größe des detektierten Antigens im <i>Western Blot</i>	Verdünnung <i>Western Blot</i>	Verdünnung Immunzytochemie	Hersteller
DDX1, NB200-348, <i>rabbit</i>	82 kDa	1:1000	1:100	Novus Biologicals LLC, Littleton, USA

DNA-PKcs/ PRKDC, A300- 519A, <i>rabbit</i>	460 kDa	1:1000	1:20	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
EF1alpha, 05-235, <i>mouse</i>	53 kDa	1:1000	1:100	EMD Millipore, Merck, Darmstadt
hnRNP E2/ PCBP2, ab96169, <i>rabbit</i>	39 kDa	1:1000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
hnRNP-H, A300- 511A, <i>rabbit</i>	50 kDa	1:10000	1:200	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
hnRNP M1-M4, ab9548, <i>mouse</i>	77 kDa	1:1000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
ILF 3, ab92355, <i>rabbit</i>	90 kDa	1:10000	1:100	Abcam, Cambridge, UK
NONO, A300- 587A, <i>rabbit</i>	54 kDa	1:2000	1:200	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
PCBP1, H00005093-A01, <i>mouse</i>	38 kDa	1:1000	1:10	Abnova, Heidelberg
RPS 6, ab12864, <i>rabbit</i>	90 kDa	1:500	1:10	Abcam, Cambridge, UK
FMRP, affi 1, <i>rabbit</i>	77 KDa; bzw.107 kDa	1:1000	1:10	Janin Schütt, UKE, Institut für Humangenetik, Hamburg
FMRP, 1C3-1a, <i>mouse</i>	78 kDa		1:200	Euromedex, Mundolsheim, Frankreich

MAP2, <i>rabbit</i>	199 kDa		1:2000	Craig Garner, Stanford University, USA
MAP2, <i>clone</i> HM-2, M4403, <i>mouse</i>	199 kDa		1:2000	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, München

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten sekundären Antikörper

Antikörper/ Spezies	Verdünnung <i>Western</i> <i>Blot</i>	Verdünnung Immunzytochemie	Hersteller
HRP (<i>horseradish peroxidase</i>)- <i>anti-rabbit, goat</i>	1:10000		Dianova, Hamburg
HRP- <i>anti-mouse, goat</i>	1:10000		Dianova, Hamburg
ALEXA Fluor 488- <i>anti-mouse, goat</i>		1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ALEXA Fluor 488- <i>anti-rabbit, goat</i>		1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ALEXA Fluor 546- <i>anti-mouse, goat</i>		1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ALEXA Fluor 546- <i>anti-rabbit, goat</i>		1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation und Kultivierung von Bakterien

Ansatz:

- 100 µl Bakterien (E. coli XL1-Blue)
- 20 µl 5x KCM (0,5 M KCL, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl)
- 1 µl Plasmid-DNA
- 80 µl H₂O
- 1 ml LB (*lysogeny broth*)-Medium

Die Herstellung von kompetenten Bakterien wurde nach Walhout (Walhout et al., 2000) durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Zur Transformation wurde die E.coli-Bakterien-Suspension auf Eis aufgetaut, mit 5x KCM, Plasmid-DNA und ddH₂O gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte für 5 Minuten die Erwärmung auf 37°C. Nach Zugabe von LB (*lysogeny broth*)-Medium wurde die Suspension für 1 Stunde im Thermomixer bei ca. 1100 rpm belassen. Anschließend wurden 70 µl der Lösung auf kanamycinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Zur Vermehrung der erfolgreich transformierten Bakterien wurde pro Konstrukt ein Klon mit einer Pipettenspitze gepickt und in 2 ml LB-Medium mit Kanamycin (25 µg/ml) für 6 Stunden bei 37°C und ca. 1100 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in 500 ml Kulturflaschen mit 200 ml LB-Medium mit Kanamycin (25 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

2.2.1.2 Isolierung der Plasmid-DNA

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien wurde das *NucleoBond Xtra Maxi EF* Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei erfolgte die Gewinnung der DNA mit Hilfe von Affinitätssäulen.

2.2.1.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Um für die folgende Transfektion von HEK-Zellen eine gleichmäßig hohe DNA-Konzentration zu verwenden, wurde die gewonnene Plasmid-DNA in einer geeigneten Verdünnung im Eppendorf Photometer gemessen und die Extinktion

bei 260 nm bestimmt. Die ermittelte DNA-Konzentration wurde bei der Transfektion (siehe 2.2.2.1) berücksichtigt.

2.2.1.4 Agarosegel

Zur Beurteilung der Qualität der gewonnenen Plasmid-DNA wurde eine Auftrennung in 1%igen Agarosegelen durchgeführt (Ausubel et al., 1999, Sambrook and Russel, 2001). Als DNA-Größenmarker diente DNA *Ladder* 100 bp, (Thermo Fisher Scientific). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 110 Volt für ca. 20 Minuten. Anschließend wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt und eine Aufnahme gefertigt.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur und Transfektion der HEK-Zellen

Es wurden HEK 293-Zellen verwendet, die in Kulturschalen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert wurden. Nährmedium war DMEM-Kulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum (FBS). Zur Gewährleistung eines normalen Wachstums wurden die Zellen regelmäßig passagiert. Hierfür erfolgte zunächst eine zweimalige Waschung mit 1xPBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4) und dann die Ablösung der Zellen von der Kulturschale mit 1% Trypsin in PBS. Anschließend wurde das Trypsin mittels frischem Nährmedium inaktiviert und die Zellen in gewünschter Verdünnung in neue Kulturschalen überführt.

Die Transfektion erfolgte, wenn die Schalen zu ca. 70% bewachsen waren. Pro Konstrukt wurden 12 Schalen transfiziert. Das Konstrukt pEGFP-FMRP wurde auf 24 Platten transfiziert. Die Transfektions-Suspension wurde aus 120 µg DNA, 12 ml DMEM-Medium und 240 µl TurboFect (Fermentas) hergestellt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde pro Schale 1 ml Suspension gleichmäßig im Nährmedium verteilt und die Zellen wurden für 48 Stunden im Brutschrank belassen. Die erfolgreiche Transfektion wurde unter dem Mikroskop überprüft, indem das Vorhandensein der Fusionsproteine anhand des grün-fluoreszierenden GFPs festgestellt wurde.

2.2.2.2 Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wurden Hippokampusneurone aus Embryonen von *Rattus norvegicus* verwendet. Die Präparation und Kultivierung erfolgte nach Banker und Goslin (Banker and Goslin, 1998) durch die AG Kindler. Die kultivierten und fixierten Neurone wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen mit 10%igem Ziegenserum (*normal goat serum*, Thermo Fisher Scientific) in 1xPBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Verdünnt in 10%igem Ziegenserum mit PBS wurden die jeweiligen primären Antikörper (Verdünnung siehe Tabelle 4), sowie ein Antikörper gegen MAP2 auf die Zellen gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit 1xPBS, bevor die sekundären Antikörper (verdünnt in 10%igem Ziegenserum in 1xPBS; Verdünnung siehe Tabelle 5) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Neurone einwirkten. Erneut wurden die Deckgläschen dreimal mit 1xPBS gewaschen und anschließend unter Verwendung von *ProLong Gold antifade reagent* DAPI (Invitrogen) auf Objektträgern eingebettet. Die Verwendung von DAPI führt zu einer Färbung der Zellkerne. Die fertigen Objektträger wurden bei 4°C gelagert.

2.2.2.3 Mikroskopie

Die immunzytochemischen Fluoreszenzsignale der gebundenen sekundären Antikörper (siehe 2.2.2.2) wurden mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops IX81 von Olympus detektiert und mittels C4742-80-12AG Digital Kamera von Hamamatsu Photonics und dem Programm CellR 3.3. von Olympus aufgenommen. Eine weitere Bearbeitung erfolgte mit *Adobe® Photoshop CC 2015* (Adobe System Incorporated) und GIMP 2.6.10 (The GIMP Team).

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Proteingewinnung mittels Affinitätschromatographie

Die Isolierung rekombinanter EGFP-markierter Proteine aus den transfizierten HEK-Zellen erfolgte mittels der GFP-*Trap*-Methode (ChromoTek, Planegg-Martinsried, Deutschland). Hierbei bindet der EGFP-Anteil der Proteine an einer aus kleinen Kügelchen bestehenden Matrix. Anschließend erfolgte die Separierung der an die Matrix gebundenen Proteine mittels Zentrifugation und die

Ablösung von der Matrix durch Denaturierung durch Kochen in 2xLaemmli-Puffer (Laemmli-Puffer: 62,5 mM Tris pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 5 % 2-Mercaptoethanol, 0,001 % Bromphenolblau). Die isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.2) und durch *Western Blot* (siehe 2.2.3.3) auf Membranen übertragen. Abschließend wurden einzelne spezifische Proteine durch spezifische Antikörper detektiert (siehe 2.2.3.4).

Herstellung der Zelllysate

Ca. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und das Medium abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 5 ml eiskaltem 1xPBS wurden die Zellen für 15 Minuten in 1 ml RIPA-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS (*sodium dodecyl sulfate*), 1% TX100, 1% Natrium-Desoxycholat, 5 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)) unter Zusatz von 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und 1 x *Protease Inhibitor Complete* (Boehringer) unter Schwenken permeabilisiert. Das entstandene Zelllysate wurde in Eppendorf-Tubes überführt, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und währenddessen alle 10 Minuten durch pipettieren gemischt. Die genomische DNA wurde mittels Pipette entfernt und das Zelllysate durch Zentrifugation (10 min.; 16.000 xg; 4°C) aufgetrennt. Die Überstände aller Lysate eines Konstruktes wurden gepoolt. Es wurden 200 µl Lysat pro Konstrukt als „Input“ abgenommen, mit 50 µl 5xLaemmli-Puffer gemischt und 5 Minuten bei 96°C gekocht.

RNA-Verdau

Das Lysat des Konstruktes 1 (pEGFP-FMRP) wurde gleichmäßig auf zwei 50 ml Falcon-Reaktionsgefäße verteilt und eines der Falcon-Reaktionsgefäße während der Affinitätschromatographie mit RNase inkubiert (0,5 µl RNase A (0,05 µg/µl, Qiagen) auf 1 ml Lysat). Während der Affinitätschromatographie wurde die vorhandene RNA in diesem Reaktionsgefäß abgebaut. Durch diese späte Trennung des Lysats auf zwei separate Reaktionsgefäße konnte sichergestellt werden, dass die später nachgewiesenen Proteine initial in beiden Ansätzen in gleicher Konzentration vorlagen.

Affinitätschromatographie

Zu den 4 gepoolten Lysaten wurden jeweils 60 µl GFP-Trap-Matrix (GFP-Trap_A, ChromoTek) hinzugefügt. Zuvor wurde die Matrix dreimal in 1 ml Dilution-Puffer (10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA) mittels Zentrifugation (2 min.; 2500 xg; 4°C) gewaschen. Nach Zugabe der Matrix wurden die Lysate für 2 Stunden bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (2 min.; 2500 xg; 4°C) und der Überstand abgenommen und verworfen. Das so separierte Matrix-Pellet wurde dreimal mittels Zentrifugation gewaschen (Waschpufferlösung: 10 ml Dilution-Puffer + 1 mM PMSF + *Protease-Inhibitor Cocktail Complete*, Boehring) und zur Elution in 200 µl 2xLaemmli-Puffer resuspendiert. Zum Lösen der Immunkomplexe von der Matrix wurde das Eluat für 10 Minuten bei 96°C gekocht.

Die so entstandenen Präzipitate und die Eingangskontrollen („*Input*“) wurden bei -80°C eingefroren und bei Bedarf auf Eis aufgetaut. Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und *Western Blot*.

2.2.3.2 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Es wurden 8%ige, 10%ige und 12%ige SDS-Gele mit einer Dicke von 0,75 mm hergestellt (Sambrook and Russel, 2001). Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurden bei kleinen Proteinen 12%ige Gele, bei großen Proteinen 8%ige Gele verwendet.

Nach Beladung des Gels erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine (Ausubel et al., 1999) bei 100 Volt, 400 mA für ca. 120 Minuten. Als Protein-Größenmarker diente *PageRuler, prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas). Als Gerät wurde das Tetra Cell System (BioRad Laboratories, Hercules, USA) verwendet.

2.2.3.3 Proteintransfer mittels *Western Blot*

Um die isolierten Proteine immunologisch detektieren zu können, erfolgte die Übertragung mittels *wet blot* (Protean II, BioRad) auf Nitrocellulose-Membranen (Fermentas). Der Transfer erfolgte nach Herstellerangaben bei 100 V, 400 mA für 90 Minuten in Transferpuffer (20% Methanol, 192 mM Glycin, 25 mM Tris pH 8,3, 0,5% SDS). Anschließend wurde die Membran in Ponceau S-Lösung (Sigma-

Aldrich) geschwenkt und mit ddH₂O gewaschen, um die erfolgreiche Übertragung der Proteinbanden zu überprüfen.

2.2.3.4 Immunologische Proteindetektion

Nach erfolgreichem Proteintransfer erfolgte die Inkubation der Membranen für 1 Stunde im *Blocking*-Puffer (10% Milchpulver in PBST (1xPBST+ 0,3% Tween 20)). Anschließend wurde der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 4) mit *Blocking*-Puffer gemischt und die Membran über Nacht bei 4°C in der Lösung geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten in PBST erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde in PBST (entsprechende Verdünnung siehe Tabelle 5). Abschließend wurde erneut dreimalig mit PBST für 10 Minuten gewaschen.

Die antikörpergebundenen Proteine konnten detektiert werden, indem die Membranen mit West Pico- und West Femto-Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) behandelt und mit unterschiedlicher Belichtungszeit (0,5 bis 45 Minuten) am Molecular Imager ChemiDOC XRS (BioRad) belichtet wurden.

3 Ergebnisse

Von der Arbeitsgruppe Kindler wurden eine Affinitätsreinigung eines rekombinanten FMRP und eine massenspektrometrische Analyse assoziierter Proteine durchgeführt. Es konnten 50 verschiedene Proteine nachgewiesen werden. Anhand der bisher bekannten Eigenschaften der identifizierten Proteine wurden für diese Arbeit 10 Proteine ausgewählt, um ihr Interaktionsverhalten mit FMRP zu überprüfen. Alle ausgewählten Proteine sind in der Lage Nukleinsäuren zu binden und sind in die Proteinbiosynthese involviert.

Ziel dieser Arbeit war es zu verifizieren, ob die putativen Interaktionspartner tatsächlich mit FMRP interagieren und ob der Aminosäure-Austausch in FMRP-I304N das Bindungsmuster von FMRP hinsichtlich der hier untersuchten Proteine verändert. Da FMRP-I304N auch zur Entstehung des Fragilen X Syndroms führt, deuten Veränderungen im Bindungsverhalten auf molekulare Ursachen der Pathologie hin und könnten so zu einem besseren Verständnis der Ursachen der Erkrankung führen.

Zur Verifizierung der massenspektrometrischen Ergebnisse wurden rekombinant hergestellte Fusionsproteine aus FMRP und EGFP in eukaryotischen Zellen exprimiert, die dann mittels Affinitätschromatographie an einer Matrix über das EGFP gebunden wurden. So konnte eine Isolierung des Proteins und seiner gebundenen Bestandteile erreicht und die Interaktionspartner kopräzipitiert werden. Es erfolgte anschließend die elektrophoretische Proteinauftrennung in einem SDS-Gel, die Übertragung mittels *Western Blot* auf Nitrocellulosemembranen und die Proteindetektion mittels spezifischer Antikörper. Zusätzlich zur Wildtypvariante des FMRP wurde auch das veränderte Protein FMRP-I304N hergestellt (siehe oben). Zur Unterscheidung einer reinen Protein-Protein-Bindung zwischen FMRP und dem untersuchten Protein oder einer RNA-abhängigen Interaktion wurde in einem Präzipitat ein RNase-Verdau durchgeführt.

3.1 FMRP (*fragile X-mental retardation protein*)

Als Nachweis der erfolgreichen Isolierung der Fusionsproteine FMRP-EGFP und FMRP-I304N-EGFP nach Affinitätschromatographie erfolgte eine *Western Blot*-Analyse mittels polyklonalem Kaninchen-Antikörper gegen FMRP. Zum besseren Verständnis folgt zunächst eine Erläuterung der einzelnen Spuren des *Western Blots* (siehe Abbildung 5), die in derselben Anordnung bei allen folgenden *Western Blots* beibehalten wird. In der Spur 1 wurde das Präzipitat der Zellen, die mit dem Plasmid pEGFP-FMRP transfiziert wurden geladen. In der Spur 2 wurde das Präzipitat der Zelllysate der Zellen aufgetrennt, die mit dem Plasmid pEGFP-FMRP-I304N transfiziert wurden. Die Präzipitate der Zelllysate der Zellen, die mit dem Plasmid pEGFP transfiziert wurden, laufen in Spur 3. Die Spur 3 dient somit als „Negativkontrolle“, indem sie eine Bindung an EGFP oder die Affinitätsmatrix unabhängig vom FMRP nachweist. In der Spur 4 laufen die der Spur 1 entsprechenden Präzipitate nach RNase-Verdau.

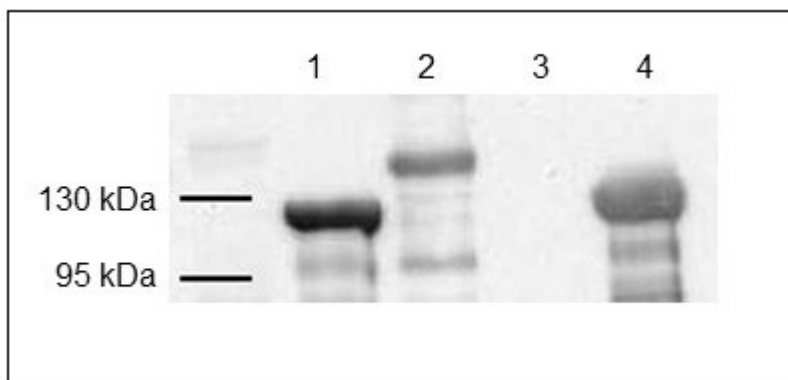


Abbildung 5: Expression von EGFP-FMRP- und EGFP-FMRP-I304N-Fusionsproteinen in HEK 293-Zellen

Beladung des Gels mit Präzipitaten aus Zelllysaten von transfizierten HEK 293-Zellen. In Spur 1+4 wird das Wildtypfusionsprotein FMRP-EGFP (vor und nach RNase-Verdau) detektiert, in Spur 2 das veränderte Fusionsprotein FMRP-I304N. Spur 3 wurde mit dem Präzipitat aus Zelllysaten von Zellen, die mit pEGFP transfiziert wurden, beladen und dient als Negativkontrolle. In Spur 3 ist kein FMRP nachweisbar. Die Proteine wurden mittels *Western Blot*-Analyse mit einem polyklonalen Antikörper anti-FMRP (1:1000) analysiert. Es wurden identische Volumina geladen. Als Proteingrößenmarker diente PageRuler, prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Weitere Erläuterungen siehe Text.

In der Abbildung 5 zeigt sich, dass das Wildtyp-Fusionsprotein in der Größe von 120 kDa (Spur 1+4) und das veränderte Fusionsprotein FMRP-I304N von 140 kDa (Spur 2) nachweisbar sind. Der auffallende Größenunterschied zwischen Wildtyp (Spur 1+4) und verändertem Protein (Spur 2) lässt sich durch eine unterschiedlich große „Verbindungsregion“ erklären. Bei der Herstellung der Vektoren für die Fusionsproteine FMRP-EGFP bzw. FMRP-I304N-EGFP wurden zwischen beiden proteinkodierenden cDNA-Abschnitten unterschiedlich lange Sequenzbereiche verwendet, sodass das FMRP-I304N-EGFP im Vergleich zu FMRP-EGFP deutlich größer ist (Schrier et al., 2004). Interessant ist, dass sich, bei gleichen Volumina in allen Spuren, in der Spur des veränderten Fusionsproteins FMRP-I304N (Abbildung 5, Spur 2) eine verminderte Konzentration des rekombinanten Proteins nachweisen lässt, sichtbar an der schmalen Bande. Im Kontroll-Extrakt (Abbildung 5, Spur 3) ist keine Bande sichtbar und somit kein FMRP nachweisbar. Es kann von einer erfolgreichen Affinitätschromatographie ausgegangen werden.

Zur besseren Übersicht erfolgt im Weiteren nach Besprechung der Ergebnisse der *Western Blots* der einzelnen untersuchten Proteine die Darstellung der Ergebnisse der immunzytologischen Färbung von embryonalen Rattenneuronen. Ziel war es, die subzelluläre Lokalisation der Proteine und eine mögliche Co-Lokalisation mit endogenem FMRP zu untersuchen. Hierfür wurde nach Extraktion und Fixierung der Neurone und Permeabilisierung der Zellmembranen eine Färbung mit MAP2-Antikörper durchgeführt, zur Darstellung der neuronalen Mikrotubuli. Dies diente gleichzeitig als Qualitätskontrolle der verwendeten Neurone. Zur subzellulären Lokalisation der 10 untersuchten Proteine erfolgte dann die Detektion mittels spezifischer Antikörper und die Beurteilung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Des Weiteren wurde eine mögliche neuronale Co-Lokalisation der putativen Interaktionspartner mit FMRP untersucht, indem zusätzlich eine Detektion des endogenen FMRP mittels Antikörper erfolgte.

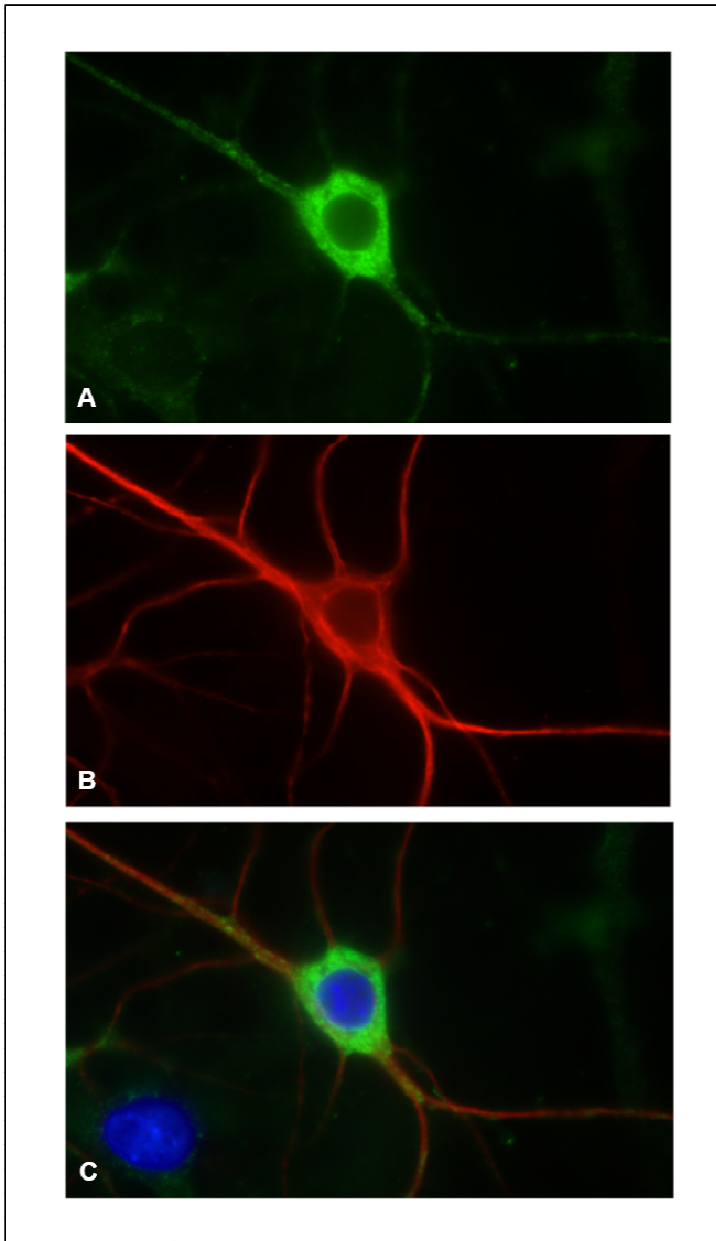


Abbildung 6: Subzelluläre Verteilung von FMRP in kultivierten

Hippokampusneuronen der Ratte

Immunzytochemische

Proteindetektion mittels primärer und sekundärer Antikörper (Verdünnung und verwendete Antikörper siehe Tabelle 4+5). **A:**

Darstellung des endogenen FMRP im perinukleären Zytoplasma und den Dendriten. **B:** Detektion von MAP2 und Darstellung der Mikrotubuli-Zytoskeletts. **C:**

Überlagerung der Farbkanäle (FMRP, grüner Kanal; MAP2, roter Kanal und DAPI-Kernfärbung, blauer Kanal).

In der Immunzytochemie an Hippocampusneuronen der Ratte kann das endogene FMRP im Zytoplasma des Zellkörpers und in den Dendriten detektiert werden (Abbildung 6, grüner Kanal). Eine besonders starke Akkumulation zeigt sich im perinukleären Zytoplasma.

3.2 DDX1 (*DEAD box protein 1*)

In der Arbeitsgruppe Kindler wurden bereits einige massenspektrometrisch gefundene Proteine auf ihr Interaktionsmuster mit FMRP untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass DDX17 und DDX5 mit FMRP interagieren. Das Protein DDX1 wurde nicht in der Massenspektrometrie nachgewiesen, besitzt aber wie alle DEAD-box Proteine eine konservierte Sequenzstruktur und Funktion (Linder et al., 1989, Godbout and Squire, 1993). Deshalb war die Analyse von DDX1 als möglicher Interaktionspartner von FMRP ebenfalls interessant. DDX1 ist eine ATP-abhängige RNA-Helikase, die in der Lage ist Basenpaarungen in doppelsträngigen RNA-Abschnitten zu spalten (Tanner and Linder, 2001).

Zum Nachweis einer möglichen Interaktion von endogenem DDX1 mit rekombinatem FMRP wurden die Präzipitate mittels eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers gegen DDX1 untersucht. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen 4 Spuren im *Western Blot* ist ein weiterer *Western Blot* dargestellt. Hier sind die Zelllysate vor Durchführung der Affinitätschromatographie als Qualitätskontrolle aufgeführt (siehe Abbildung 7A). In der weiteren Präsentation der Ergebnisse dieser Arbeit ist diese Darstellung zu jedem untersuchten Protein zu finden. *Input 1* (Abbildung 7A, Spur In1) ist mit dem Zelllysate der Zellen beladen, die rekombinantes FMRP-EGFP herstellen. Im *Input 2* (Abbildung 7A, Spur In2) ist das Lysat der Zellen mit Expression des veränderten Fusionsproteins FMRP-I304N-EGFP und im *Input 3* (Abbildung 7A, Spur In3) das Zelllysate der Kontrollgruppe mit Expression von EGFP geladen. Können die zu untersuchenden Proteine in der nach Herstellerangaben zu erwarteten Größe detektiert werden, ist der verwendete Antikörper spezifisch und eine Kreuzreaktivität kann ausgeschlossen werden.

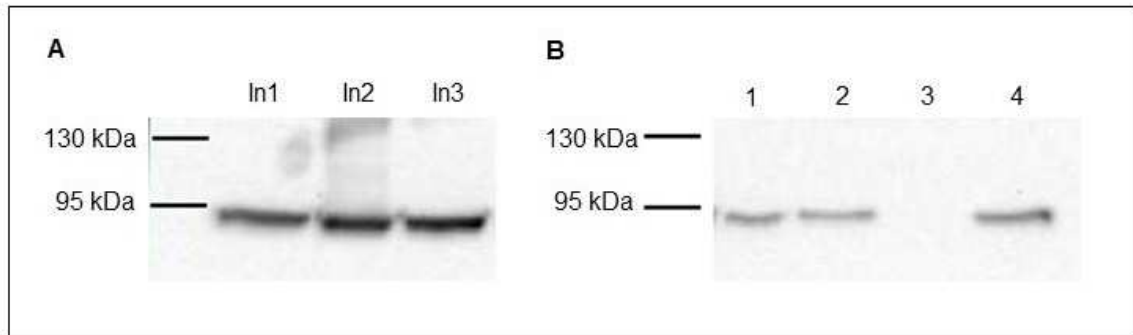


Abbildung 7: Nachweis von endogenem DDX1 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)

A: Nachweis des endogenen DDX1 in Zelllysaten. In der Spur In1 ist das Zelllysate der Zellen geladen, die FMRP-EGFP herstellen, in In2 das Zelllysate der Zellen mit Expression von FMRP-I304N und in In3 das Zelllysate der Kontrollgruppe mit Expression von EGFP. Der verwendete Antikörper detektiert spezifisch DDX1. **B:** In den Präzipitaten mit dem Wildtypfusionsprotein (Spur 1+4) und mit FMRP-I304N (Spur 2) ist DDX1 nachweisbar. Im Kontroll-Extrakt ist kein Protein nachweisbar (Spur 3). Nach RNase-Verdau ist DDX1 weiterhin detektierbar (Spur 4), die Interaktion von FMRP mit DDX1 ist folglich RNA-unabhängig. Verwendete Antikörper und Verdünnung siehe Tabelle 4+5. Als Proteingrößenmarker diente PageRuler, prestained Protein Ladder Plus (Fermentas).

Es zeigen sich Banden in der Größe von ca. 90 kDa. Das endogene DDX1 ist in allen drei Zelllysaten nachweisbar (Abbildung 7A, Spur In1, In2, In3), sodass eine Kreuzreaktivität des Antikörpers ausgeschlossen werden kann. DDX1 ist sowohl im Präzipitat des Wildtypfusionsproteins (Abbildung 7B, Spur 1), als auch im Präzipitat des veränderten Proteins FMRP-I304N (Abbildung 7B, Spur 2) nachweisbar. DDX1 wird auch nach Abbau der RNA im Präzipitat (Abbildung 7B, Spur 4) detektiert, sodass die Interaktion nicht RNA-abhängig erfolgt. Zusammengefasst deuten diese Befunde darauf hin, dass DDX1 ein spezifischer Interaktionspartner von FMRP ist, sowohl das Wildtypprotein, als auch das veränderte Protein bindet und die Interaktion RNA-unabhängig erfolgt.

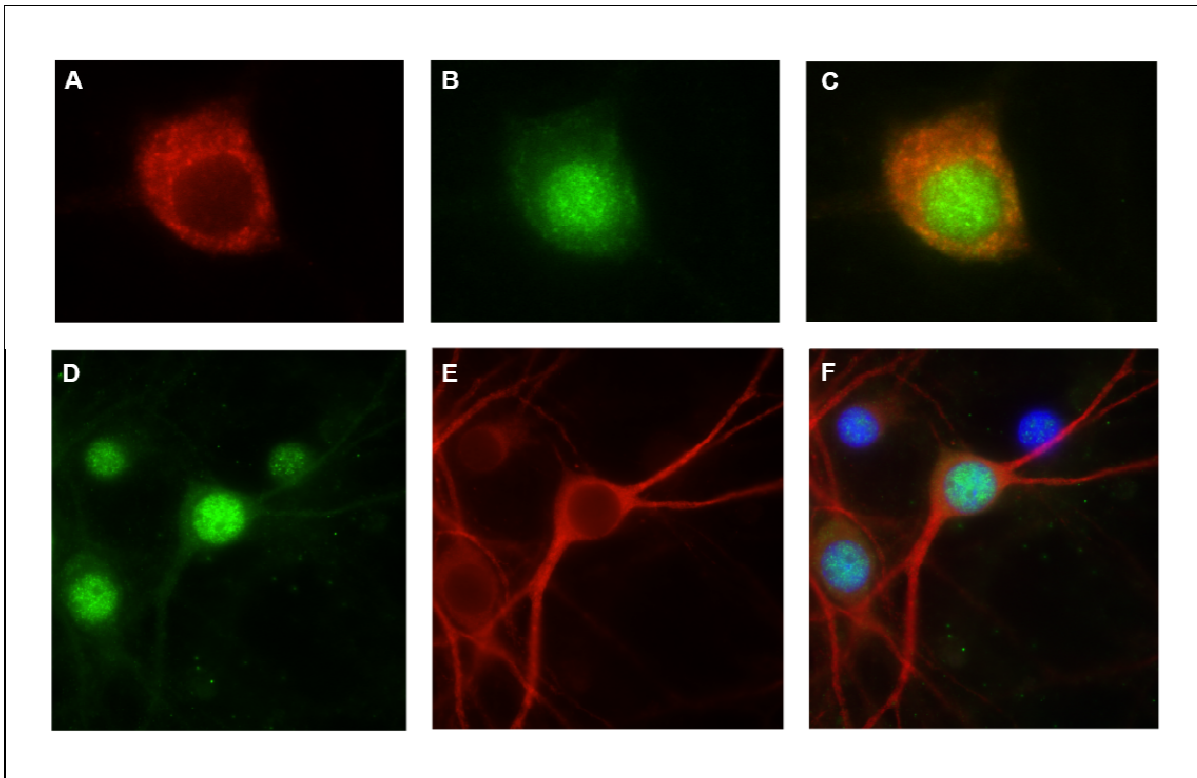


Abbildung 8: Zelluläre Verteilung von DDX1 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte)

Immunzytochemische Proteindetektion mittels primärer und sekundärer Antikörper (Verdünnung und verwendete Antikörper siehe Tabelle 4+5). **A:** Darstellung des endogenen FMRP im perinukleären Zytoplasma. **B+D:** Detektion von DDX1 und Darstellung im Nucleus und Zytoplasma. **C:** Überlagerung der Farbkanäle (FMRP, grüner Kanal; DDX1, roter Kanal) zur Darstellung der Co-Lokalisation beider Proteine im Zytoplasma (Gelbfärbung). **E:** Darstellung des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch MAP2-Färbung. **F:** Überlagerung der Farbkanäle (DDX1, grüner Kanal; MAP2, roter Kanal, DAPI-Kernfärbung, blauer Kanal).

In der Immunzytochemie an Hippokampusneuronen der Ratte ist die Lokalisation von DDX1 im Nucleus deutlich detektierbar (Abbildung 8B+D, grüner Kanal), auch im Zytoplasma lässt sich endogenes DDX1 nachweisen. Dort ist auch eine Co-Lokalisation mit FMRP darstellbar, sichtbar an der Gelbfärbung nach Überlagerung beider Farbkanäle (Abbildung 8C).

3.3 EF1alpha (*Elongation factor 1 alpha*)

EF1alpha als GTP-abhängiger Elongationsfaktor spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proteinsynthese (Miller and Weissbach, 1977).

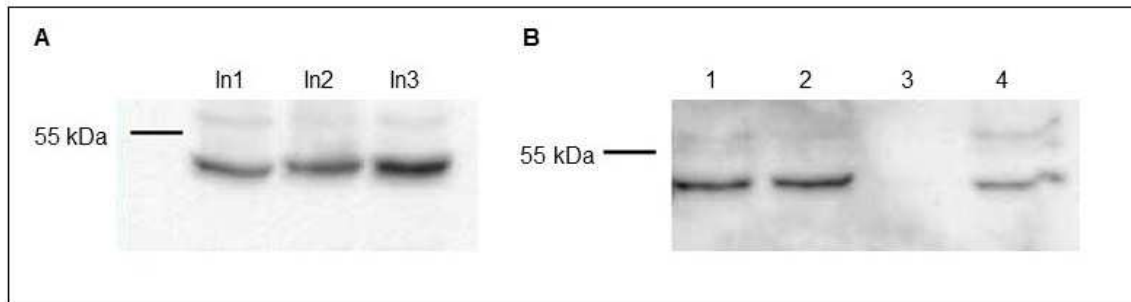


Abbildung 9: Nachweis von endogenem EF1alpha in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)

Durchführung eines *Western Blots* zum Nachweis von EF1alpha (verwendete Antikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 4+5). Im *Input* (A: Spur In1, In2, In3), und im Präzipitat der Zellen mit Expression von Wildtyp (B: Spur 1+4)- und FMRP-I304N (B: Spur 2)-Fusionsprotein ist EF1alpha nachweisbar. In der Kontrolle wird kein Protein detektiert (B: Spur 3). Auch nach RNA-Abbau ist EF1alpha nachweisbar (B: Spur4). Als Proteingrößenmarker diente PageRuler, prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Für weitere Erklärungen siehe Abbildung 7.

Nach Inkubation der Membran mit einem monoklonalen Antikörper gegen EF1alpha zeigte sich ein Proteinnachweis in der Größe von 53 kDa im *Western Blot* (Abbildung 9A: Spur In1, In2, In3). Nach Affinitätschromatographie ist das Protein, mit Ausnahme der EGFP-Kontrolle (Abbildung 9B, Spur 3), in allen drei aufgeführten Präzipitaten nachweisbar (Abbildung 9B: Spur 1, 2 und 4). EF1alpha zeigte sich als spezifischer Interaktionspartner von FMRP. Da sowohl beim Wildtypfusionsprotein, als auch beim veränderten Fusionsprotein FMRP-I304N eine Bande detektiert wird, scheint die Punktmutation die Interaktion nicht zu beeinflussen. Es ist von einer direkten oder indirekten Protein-Protein-Interaktion zwischen EF1alpha und FMRP auszugehen, die RNA-unabhängig erfolgt.

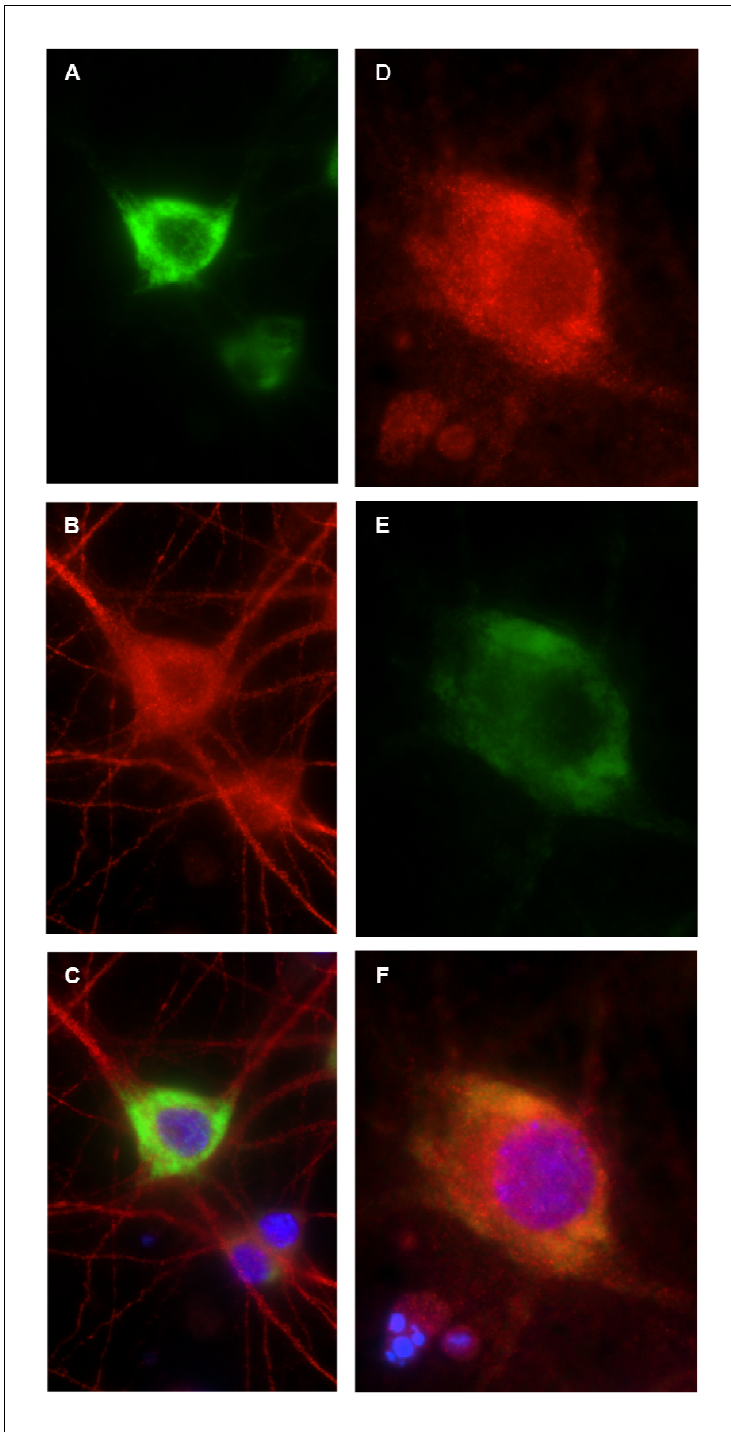


Abbildung 10: Zelluläre Verteilung von EF1alpha und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte)

Durchführung einer immunzytochemischen Färbung (primäre und sekundäre Antikörper mit Verdünnung siehe Tabelle 4+5). **A+E:** Detektion von EF1alpha im Zytoplasma mit Aussparung der Dendriten. **B:** Detektion des endogenen MAP2 zur Darstellung des Zytoskeletts. **C:** Überlagerung der Farbkanäle (EF1alpha, grüner Kanal; MAP2, roter Kanal, DAPI-Kernfärbung, blau). **D:** Das endogene FMRP wird ebenfalls im Zytoplasma detektiert. **F:** Die Co-Lokalisation beider Proteine ist im Zytoplasma sichtbar (Gelbfärbung). Der Zellkern ist mit DAPI-Kernfärbung im blauen Kanal dargestellt.

In der Immunzytochemie lässt sich EF1alpha im Zytoplasma der Nervenzelle unter Aussparung der peripheren Dendriten nachweisen. EF1alpha zeigt somit ein ähnliches intrazelluläres Verteilungsmuster wie FMRP, die Co-Lokalisation beider Proteine wird bei Überlagerung der Farbkanäle durch die Gelbfärbung sichtbar (Abbildung 10F).

3.4 NONO (*Non-POU domain-containing octamer-binding protein*)

Ein weiteres Protein, das in der Massenspektrometrie als putativer Interaktionspartner von FMRP detektiert wurde, ist das Protein NONO. NONO ist an der Regulation der Transkription beteiligt (Basu et al., 1997, Dong et al., 2007, Park et al., 2013).

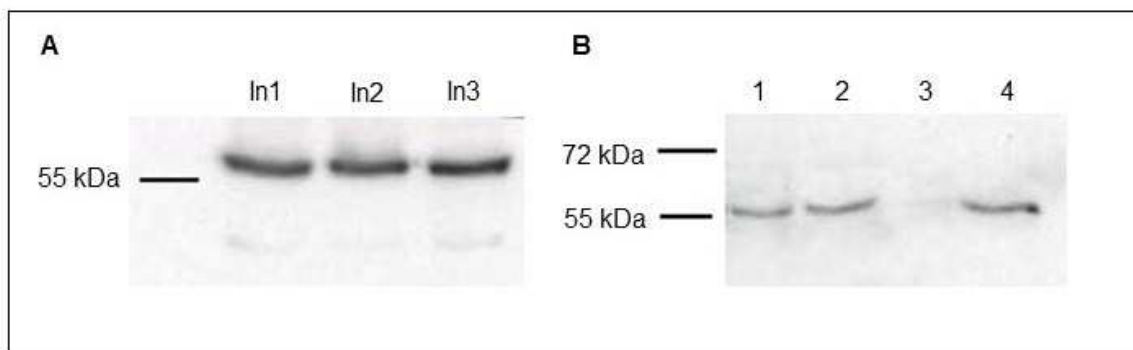


Abbildung 11: Nachweis von endogenem NONO in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)

Nachweis von NONO in Zelllysaten vor Affinitätschromatographie (A: Spur In1, In2, In3) im *Western Blot*. Im Präzipitat mit Expression von Wildtyp (B: Spur 1+4)- und FMRP-I304N (B: Spur 2)-Fusionsprotein ist NONO nachweisbar. Auch nach RNase-Verdau wird NONO detektiert (B: Spur 4). In der EGFP-Kontrolle erfolgt kein Proteinnachweis (B: Spur 3). Die Proteingröße wurde mittels PageRuler, prestained Protein Ladder Plus (Fermentas) ermittelt. Verwendete Antikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 4+5. Für weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Der verwendete monoklonale Antikörper gegen NONO erkennt spezifisch ein Protein mit der Größe von ca. 56 kDa (Abbildung 11A, Spur In1, In2, In3). Die Präzipitate, die FMRP enthalten, enthalten ebenfalls NONO (Abbildung 11B, Spur, 1,2 und 4). In der Kontrolle wird kein Protein detektiert (Abbildung 11B, Spur 3). NONO lässt sich demnach als Interaktionspartner von FMRP und FMRP-I304N nachweisen. Die Interaktion erfolgt über eine Protein-Protein-Interaktion, die offensichtlich nicht von der intakten KH2-Domäne des FMRP abhängig ist.

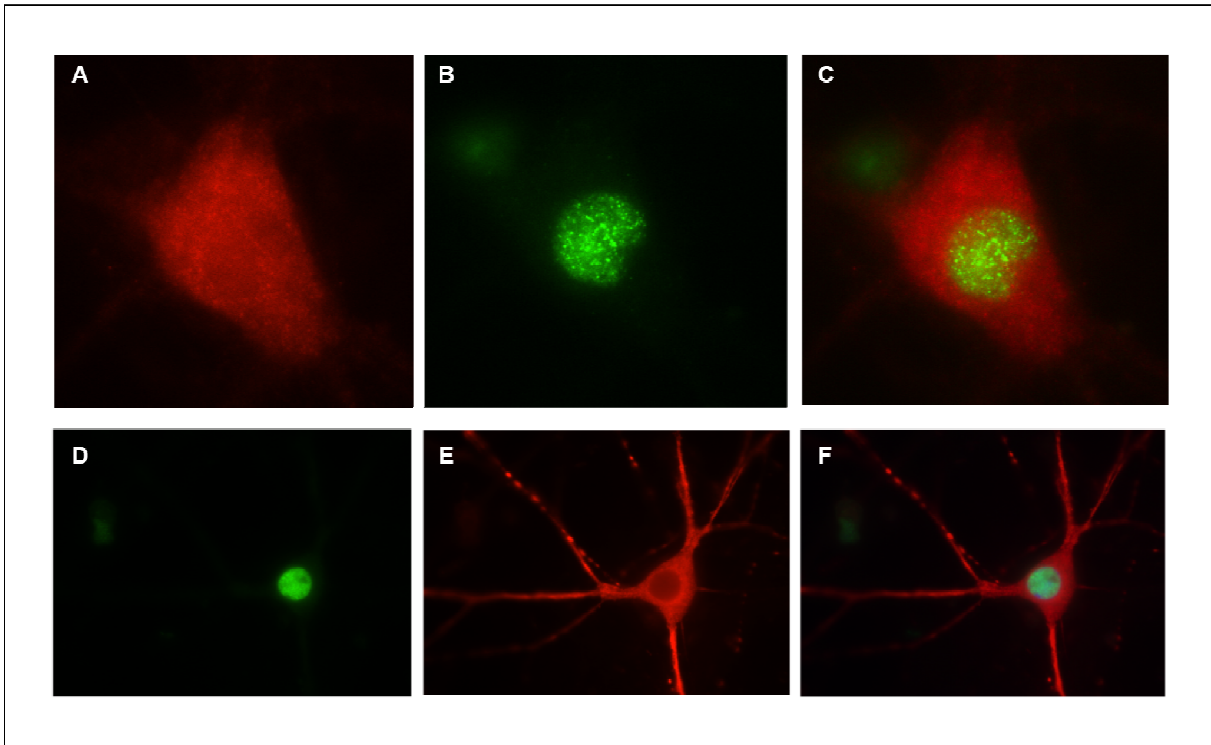


Abbildung 12: Zelluläre Verteilung von NONO und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte)

Die Proteindetektion erfolgte mittels Immunzytochemie (verwendete Antikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 4+5). **A:** Nachweis des endogenen FMRP im Zytosol und im Nucleus. **B+D:** Detektion von NONO im Nucleus mit granulärer Verdichtung. **C:** Eine Co-Lokalisation von NONO und FMRP erfolgt nicht. **E:** Darstellung des neuronalen Zytoskeletts durch MAP2-Färbung. **F:** Überlagerung der Kanäle (NONO, grüner Kanal; MAP2, roter Kanal; DAPI-Kernfärbung, blauer Kanal).

Im immunzytochemischen Nachweis in kultivierten Rattenneuronen aus dem Hippocampus lässt sich NONO nahezu ausschließlich im Zellkern detektieren, hier zeigen sich inhomogene Verdichtungen in Form von Granula (Abbildung 12B). Das Zytoplasma ist nicht gefärbt. Bei Überlagerung der Farbkanäle für FMRP und NONO lässt sich keine Co-Lokalisation nachweisen. Möglicherweise kommt es nur zu einer transienten Interaktion beider Proteine im Zellkern.

3.5 PRKDC (*Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Polypeptide*)

PRKDC ist eine Proteinkinase und beeinflusst die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (Gottlieb and Jackson, 1993).

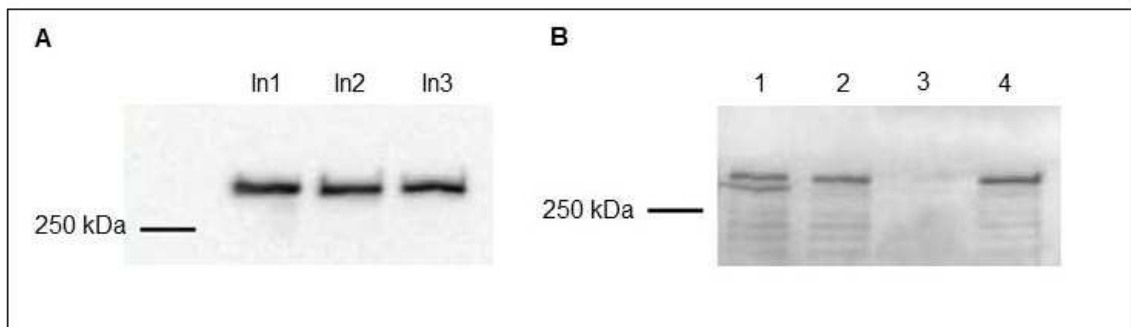


Abbildung 13: Nachweis von endogenem PRKDC in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)

Durchführung eines *Western Blots* (verwendete Antikörper und Verdünnung siehe Tabelle 4+5). Nachweis von PRKDC im Zellextrakt (A: Spuren In1, In2, In3) und in den Präzipitaten mit Expression des Wildtypproteins, sowohl mit als auch ohne RNase-Behandlung, (B: Spur 1+4), und des veränderten Protein FMRP-I304N (B, Spur 2). Im Kontroll-Präzipitat zeigt sich keine Bande (B: Spur 3). Ermittlung der Proteingröße mittels PageRuler, prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Für weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Das Protein PRKDC konnte sowohl in den Kontrollen (Abbildung 13A, Spur In1, In2, In3) als auch in allen Präzipitaten, die FMRP beinhalten, nachgewiesen werden (Abbildung 13B, Spur 1,2 und 4). Auch nach RNA-Abbau zeigt sich ein Proteinnachweis (Abbildung 13B, Spur 4). PRKDC lässt sich somit ebenfalls als spezifischer Interaktionspartner von FMRP nachweisen, der über eine Protein-Bindung unabhängig von RNA mit FMRP interagiert. Es zeigt sich kein verändertes Bindungsverhalten zum Protein FMRP-I304N.

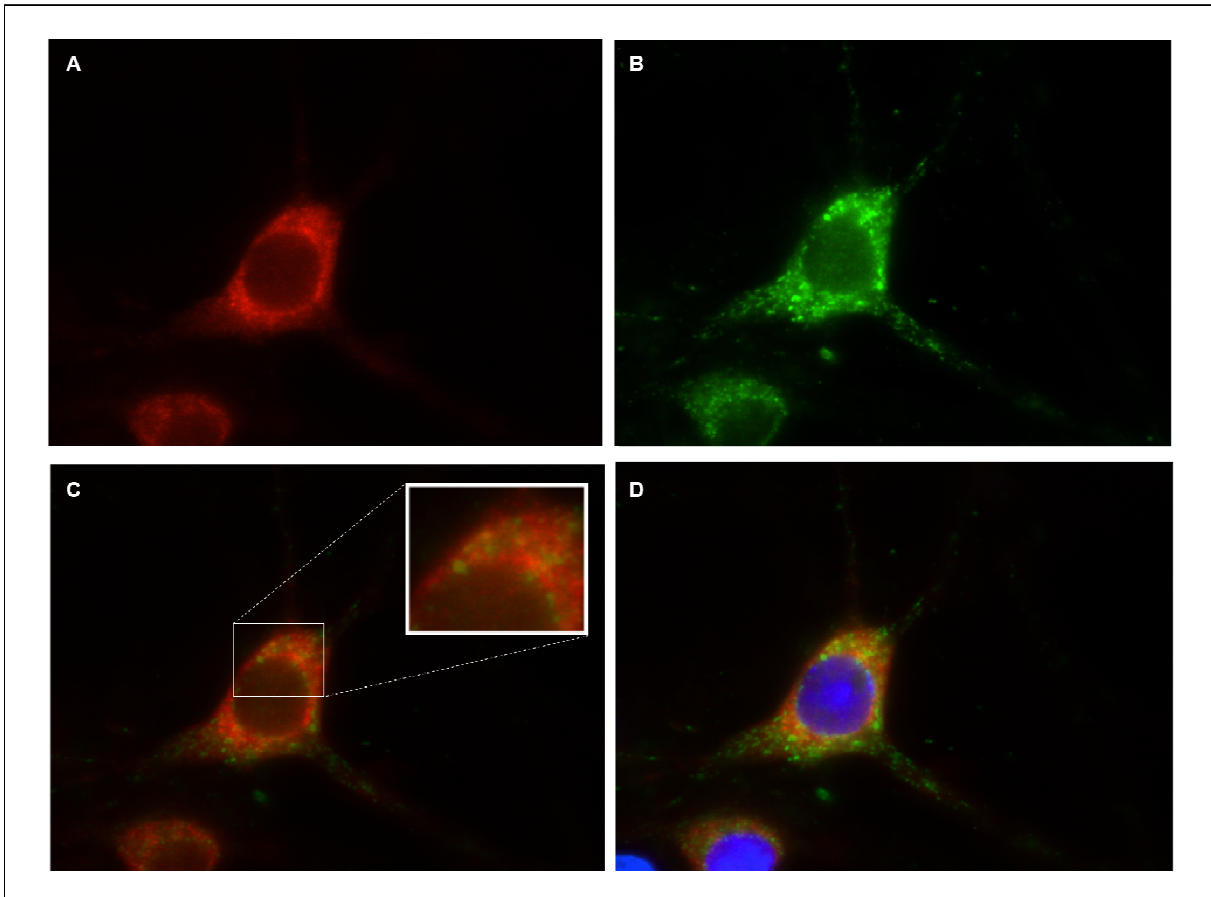


Abbildung 14: Zelluläre Verteilung von PRKDC und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte)

Mittels Immunzytochemie erfolgte eine intrazelluläre Proteindetektion (verwendete Antikörper und Verdünnung siehe Tabelle 4+5). **A:** Darstellung des endogenen FMRP im Zytoplasma. **B:** Lokalisation von PRKDC im Zytoplasma mit granulärem Verteilungsmuster. **C:** Es findet sich eine Co-Lokalisation im perinukleären Zytoplasma, sichtbar an den gelben Granula. **D:** Überlagerung aller Farbkanäle (FMRP, roter Kanal; PRKDC, grüner Kanal; DAPI-Kernfärbung, blauer Kanal).

Der Lokalisationsnachweis des endogenen PRKDC mittels Immunzytochemie in Hippocampusneuronen der Ratte zeigt eine deutliche Ansammlung im perinukleären Zytoplasma. Im Zellkern und in den peripheren Dendriten lässt sich das Protein nicht detektieren (Abbildung 14B). Beide endogenen Proteine co-lokalisieren im perinukleären Zytoplasma in Granula, was sich an der Gelbfärbung bei Überlagerung der beiden Farbkanäle für FMRP und PRKDC zeigt (Abbildung 14C).

3.6 RPS6 (40S ribosomal protein S6)

Ein weiteres vielversprechendes Protein, das unabhängig von den Ergebnissen der Massenspektrometrie untersucht wurde, ist RPS6. Es ist eine Komponente der 40S-Untereinheit der Ribosome (Robledo et al., 2008) und ist als solches an der Proteinbiosynthese beteiligt (Ruvinsky et al., 2005).

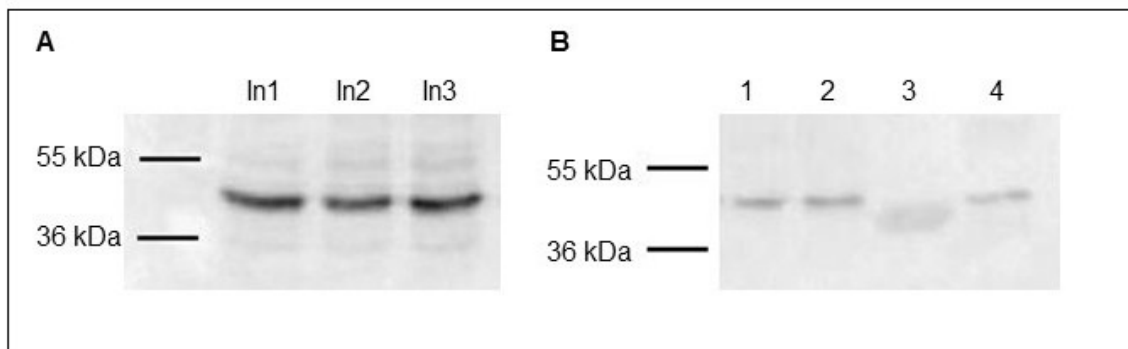


Abbildung 15: Nachweis von endogenem RPS6 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)

Nachweis von RPS6 im Zellextrakt (A: Spur In1, In2, In3) und im Präzipitat mit Expression von Wildtyp (B: Spur 1+4)- und FMRP-I304N (B: Spur 2)-Fusionsprotein mittels *Western Blot*. RPS6 kann auch nach Behandlung des Präzipitats mit RNase detektiert werden (B: Spur 4). In der Kontrolle ist kein Protein nachweisbar (B: Spur 3). Der PageRuler, prestained Protein Ladder Plus (Fermentas) diente als Proteingrößenmarker. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 4+5 dargestellt. Für weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

In der Immundetektion mit spezifischem Antikörper gegen RPS6 kann eine Proteinbande der Größe 32 kDa detektiert werden (Abbildung 15 A+B). Es zeigen sich spezifische Banden in allen mit FMRP-beladenen Fraktionen (Abbildung 15B, Spur 1, 2+4). Die Kontrolle zeigt keinen Proteinnachweis (Abbildung 15B, Spur 3). RPS6 ist folglich ein spezifischer Interaktionspartner von FMRP, die Assoziation scheint RNA-unabhängig zu erfolgen. Die veränderte KH2-Domäne in FMRP-I304N beeinflusst die Interaktion nicht.

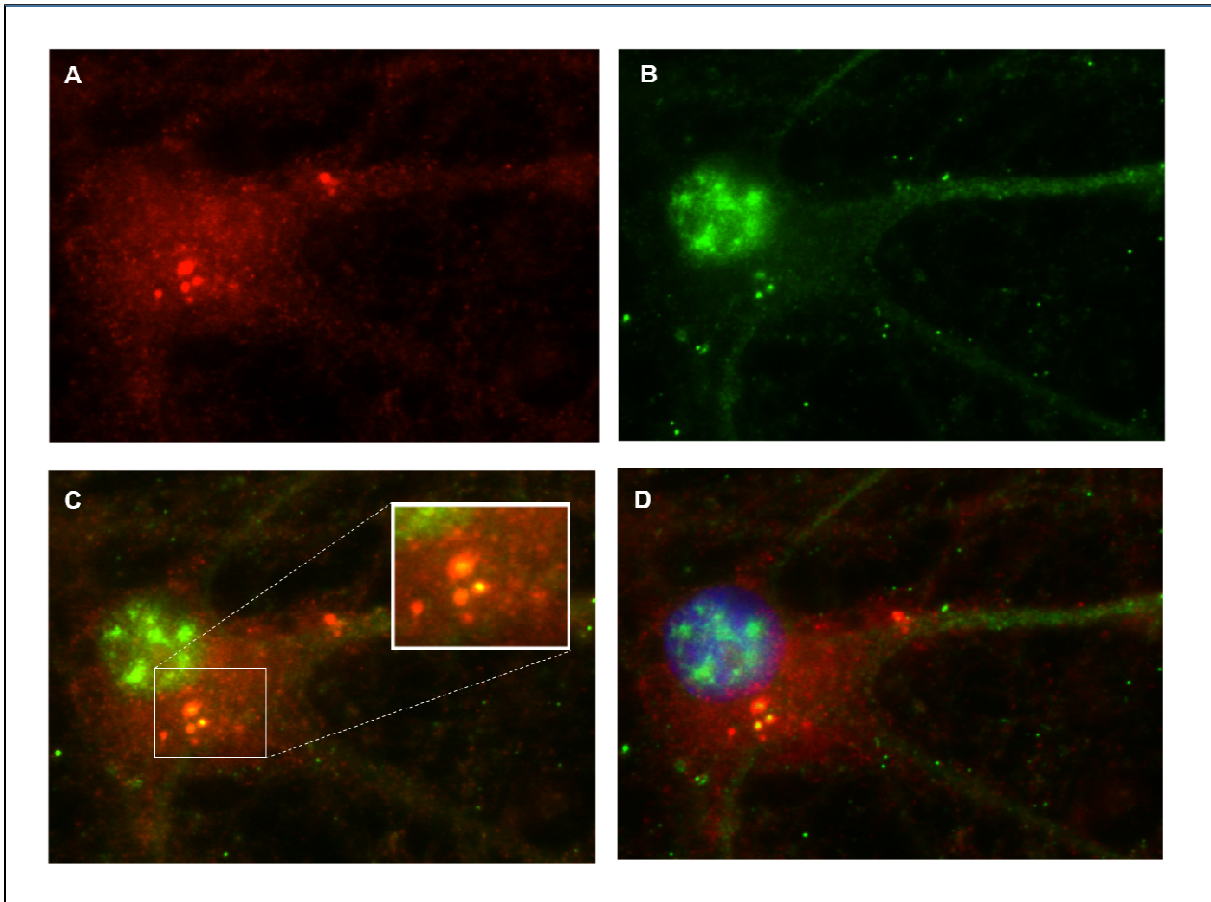


Abbildung 16: Zelluläre Verteilung von RPS6 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte)

A: Immunzytochemischer Nachweis von FMRP im Zytoplasma und Nucleus. **B:** RPS6 kann im Nucleus mit spezieller Konzentration in Granula und im Zytoplasma detektiert werden. **C:** Eine Co-Lokalisation beider Proteine zeigt sich im Zytoplasma (Gelbfärbung). **D:** Überlagerung aller Farbkanäle (FMRP, roter Kanal, RPS6 grüner Kanal, DAPI-Kernfärbung, blauer Kanal). Verwendete Antikörper und Verdünnung siehe Tabelle 4+5).

Einen weiteren Hinweis auf eine Assoziation von RPS6 und FMRP zeigt sich in der Immunzytochemie an Rattenneuronen. RPS6 lässt sich mit granulärem Zeichnungsmuster sowohl im Zellkern, insbesondere in den Nucleoli, als auch im gesamten Zellplasma bis zu den peripheren Dendriten nachweisen (Abbildung 16B). Eine Co-Lokalisation mit FMRP lässt sich vor allem im perinukleären Zytoplasma detektieren, sichtbar an der Gelbfärbung nach Überlagerung der Farbkanäle von FMRP und RPS6 (Abbildung 16C).

3.7 ILF3 (*Interleukin enhancer-binding factor 3*)

Das Protein ILF3 ist vermutlich bei der Regulation der Genexpression (Reichman et al., 2002, Reichman and Mathews, 2003, Reichman et al., 2003, Nakadai et al., 2015) und der Stabilisierung von mRNAs beteiligt (Shim et al., 2002). Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene Isoformen des Proteins (Duchange et al., 2000)

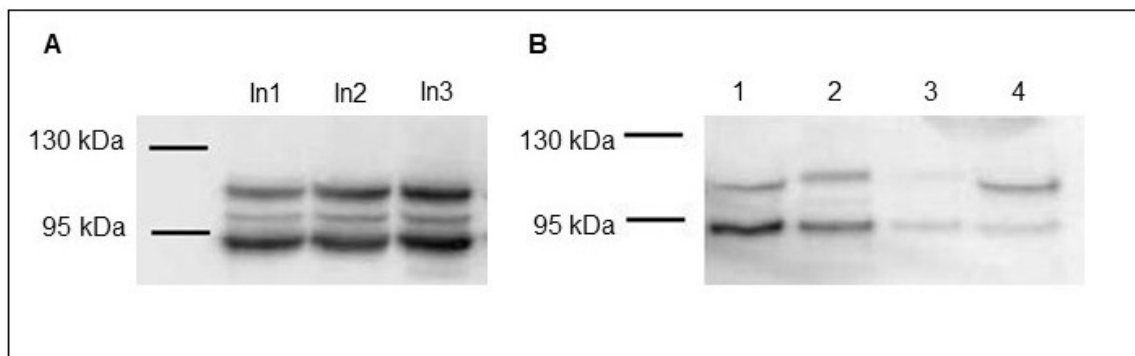


Abbildung 17: Nachweis von endogenem ILF3 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)

Detektion der Proteine mittels *Western Blot* (verwendete Antikörper und Verdünnung siehe Tabelle 4+5). Der PageRuler, prestained Protein Ladder Plus (Fermentas) diente als Größenmarker.

Der Antikörper gegen ILF3 erkennt 3 Isoformen (A: Spur In1, In2, In3). Von diesen Isoformen sind nur zwei nach Affinitätschromatographie nachweisbar (B: Spur 1-4), wobei die größere Isoform in der Kontrolle negativ ist, die kleinere Isoform in der Kontrolle einen Proteinnachweis zeigt (B: Spur 3). Im Präzipitat mit Expression des Wildtypproteins nach RNase-Verdau zeigt sich bei der kleineren Isoform eine schwächere Bande als vor der RNase-Zugabe (B: Spur 4), dies weist auf eine Interaktion mittels RNA hin. Für weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Präzipitate erfolgte die Detektion von ILF3 mittels spezifischem Antikörper. In der Analyse der Kontrollen werden drei Proteine unterschiedlicher Größe detektiert (Abbildung 17A). Hierbei handelt es sich möglicherweise um unterschiedliche bekannte Isoformen des Proteins. In der Analyse der Präzipitate sind nur noch zwei Proteine in den Größen 110 kDa und 90 kDa nachweisbar (Abbildung 17B). Die Proteinisoform in der Größe 110 kDa lässt sich in allen mit FMRP beladenen Präzipitatzubereitungen detektieren (Abbildung 17B, Spur 1, 2+4), die EGFP-Kontrolle ist negativ (Abbildung 17B, Spur 3). Es

zeigt sich also eine spezifische Interaktion zwischen ILF3-110 kDa und FMRP bzw. FMRP-I304N, die RNA-unabhängig erfolgt.

Im Proteinnachweis der 90 kDa-Isoform zeigt sich eine schwache Bande in der EGFP-Kontrolle (Abbildung 17B, Spur 3). Nach RNase-Verdau (Abbildung 17B, Spur 4) ist im Vergleich zum reinen Wildtyppräzipitat und dem Präzipitat des veränderten Proteins FMRP-I304N (Abbildung 17B, Spur 1+2) eine sehr viel geringere Menge an Protein detektierbar. Diese Proteinisoform scheint also kein spezifischer Interaktionspartner zu sein, da sie sich auch unabhängig von der Anwesenheit von FMRP nachweisen lässt und eine unspezifische Interaktion mit EGFP zeigt. Eine Interaktion mit FMRP ist jedoch trotzdem zu vermuten, da die Bande in Spur 3 (Abbildung 17B) deutlich schwächer ausgeprägt ist als in den Spuren 1 und 2. Das vorliegende Ergebnis deutet auf eine RNA-abhängige, möglicherweise über RNA-Moleküle vermittelte Interaktion der Proteine hin.

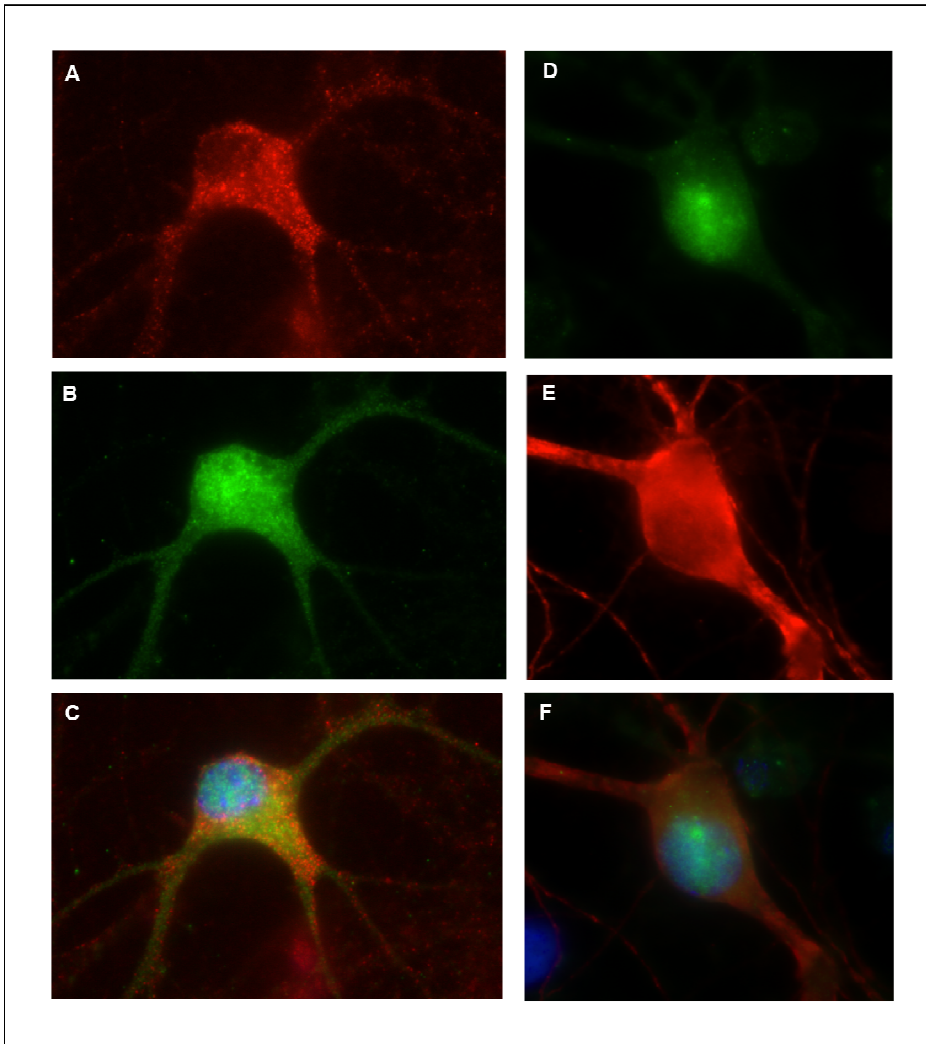


Abbildung 18: Zelluläre Verteilung von ILF3 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte)

A: Nachweis von FMRP im Zytoplasma. **B+D:** ILF3 kann im Nucleus und Zytoplasma detektiert werden. **C:** Eine Co-Lokalisation beider Proteine ist vereinzelt im Zytoplasma an einer Gelbfärbung nachweisbar (mit zusätzlicher DAPI-Kernfärbung, blauer Kanal). **E:** Detektion des endogenen MAP2. **F:** Überlagerung der Farbkanäle (ILF3, grüner Kanal; MAP2, roter Kanal; DAPI-Kernfärbung, blauer Kanal). Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper und Verdünnungen der Immunzytochemie zeigt Tabelle 4+5.

Ein weiterer Hinweis auf eine Assoziation von FMRP mit ILF3 zeigt sich in den immunzytochemischen Aufnahmen. ILF3 lässt sich sowohl im Nucleus, als auch im Zytoplasma bis in die peripheren Dendriten von Rattenneuronen aus dem Hippocampus nachweisen (Abbildung 18 B+D). Es zeigt sich eine Co-Lokalisation von FMRP und ILF3 vor allem im kernnahen Zytoplasma der Zelle (Abbildung 18C).

3.8 hnRNP-H und hnRNP M1-M4 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*)

Über die Funktion von hnRNP-H und -M ist bekannt, dass sie Bestandteile von hnRNP-Komplexen sind (Dreyfuss et al., 1993) und die Fähigkeit besitzen prä-mRNAs zu binden (Datar et al., 1993). Sie sind Spleiß-Regulatoren (Paul et al., 2006) und können den Transport von spezifischer mRNA aus dem Nucleus verhindern (Kim et al., 2005).

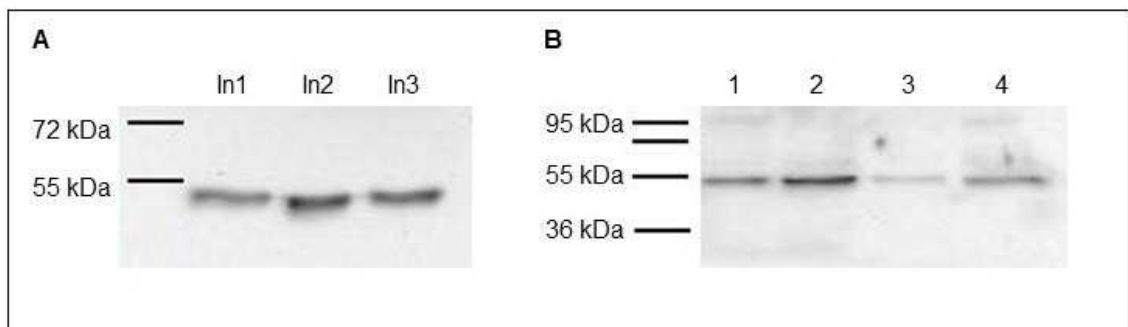


Abbildung 19: Nachweis von endogenem hnRNP-H in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)

Nachweis von hnRNP-H mittels *Western Blot* in Zelllysaten. Im Lysat vor Präzipitation wird hnRNP-H detektiert (A: Spur In1, In2, In3). hnRNP-H ist auch im Präzipitat mit dem Wildtypfusionsprotein (B: Spur 1+4) und dem Fusionsprotein FMRP-I304N (B: Spur 2) nachweisbar. Im Kontroll-Präzipitat zeigt sich ebenfalls eine schwache Bande (B: Spur 3), die auf eine zusätzliche unspezifische Reaktion mit EGFP hindeutet. Nach RNA-Behandlung wird ebenfalls hnRNP detektiert (B: Spur 4). Verwendete Antikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 4+5. Ermittlung der Proteingröße mittels PageRuler, prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Für weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

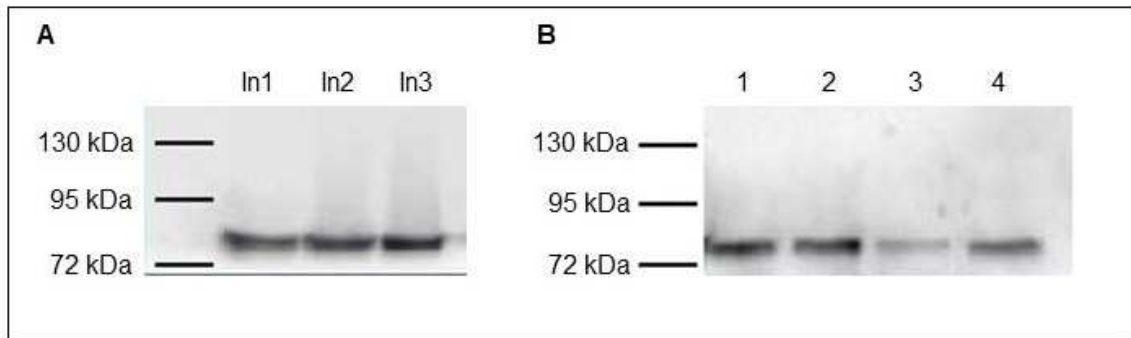


Abbildung 20: Nachweis von endogenem hnRNP M1-M4 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor (A) bzw. nach Affinitätschromatographie (B)

Nachweis des Proteins hnRNP-M1-M4 im Zellysate (A: Spur In1, In2, In3), in den Präzipitaten mit Expression des Wildtypfusionsproteins vor und nach RNase-Behandlung (B: Spur 1+4) und des Fusionsproteins FMRP-I304N (B: Spur 2). Im Kontroll-Präzipitat zeigt sich ebenfalls eine schwache Bande (B: Spur 3), die auf eine zusätzliche unspezifische Reaktion mit EGFP hindeutet. Die für die Durchführung des *Western Blots* verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 4+5 dargestellt. Als Proteingrößenmarker diente der PageRuler, prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Für weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

Mittels Antikörper werden beide Proteine in einer Größe von ca. 56 kDa (hnRNP-H) und von ca. 77 kDa (hnRNP-M) detektiert (Abbildung 19A+20A). Beide Proteine sind in den Präzipitaten von FMRP (mit und ohne RNase-Zusatz) und FMRP-I304N nachweisbar (Abbildung 19B+20B, Spur 1, 2 und 4). In der Kontrolle (Abbildung 19B+20B, Spur 3) werden die Proteine ebenfalls in einer schwachen Bande detektiert und sind somit auch unabhängig von FMRP nachweisbar. hnRNP-H und -M scheinen an EGFP oder die Matrix zu binden. Beide Proteine können somit nicht als spezifische Interaktionspartner von FMRP identifiziert werden. Die Bande in der Spur 3 (Abbildung 19B+20B) ist jedoch deutlich schwächer als in den anderen Präzipitaten, sodass eine Interaktion mit FMRP dennoch wahrscheinlich ist. Diese Interaktion findet über eine indirekte oder direkte Protein-Protein-Interaktion statt.

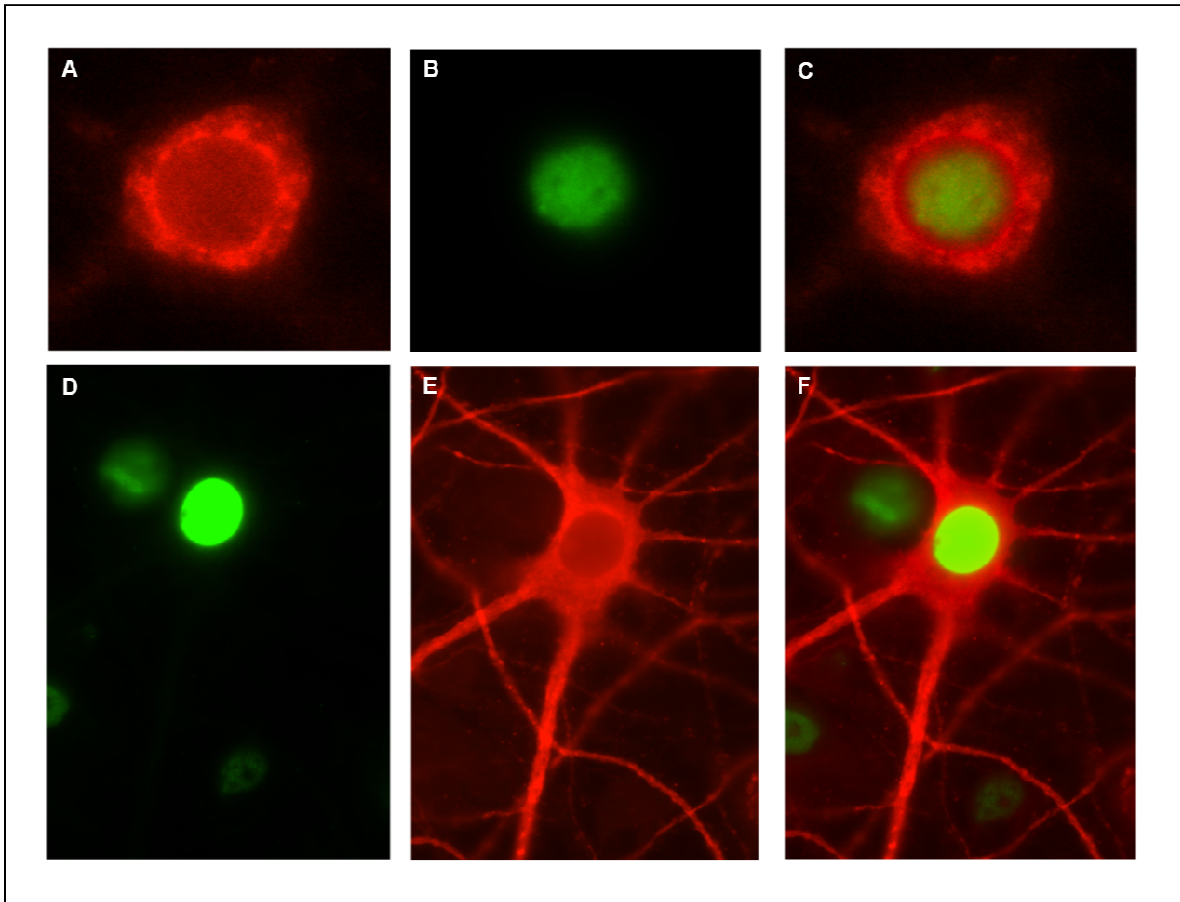


Abbildung 21: Zelluläre Verteilung von hnRNP-H und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte)

Immunzytochemische Proteindetektion mittels primärer und sekundärer Antikörper (verwendete Antikörper und Verdünnung siehe Tabelle 4+5). **A:** Darstellung des endogenen FMRP im Zytoplasma und Nucleus. **B+D:** hnRNP-H wird ausschließlich im Nucleus dargestellt. **C:** Bei Überlagerung der Kanäle (hnRNPH, grüner Kanal; FMRP, roter Kanal) ist keine Co-Lokalisation von hnRNP-H und FMRP nachweisbar. **E:** Detektion von MAP2. **F:** Überlagerung der Kanäle (hnRNP-H, grüner Kanal; MAP2, roter Kanal).

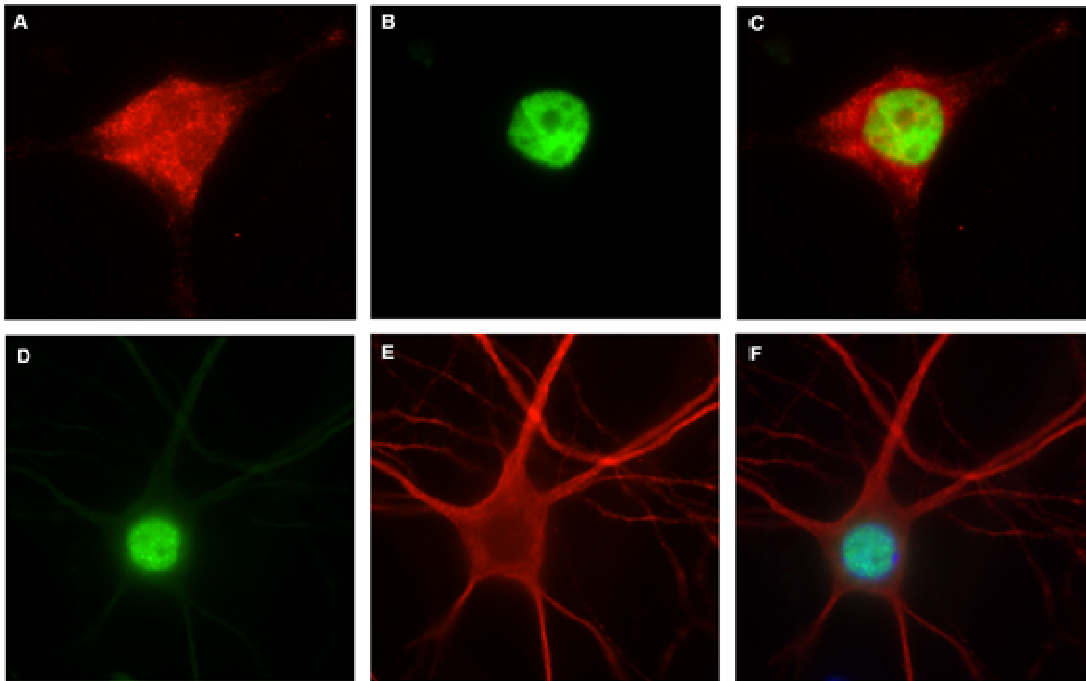


Abbildung 22: Zelluläre Verteilung von hnRNP M1-M4 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte)

A: In der immunzytochemischen Detektion wird FMRP im Zytoplasma und Nucleus nachgewiesen. **B+D:** hnRNP M1-M4 wird im Nucleus lokalisiert. **C:** In der Überlagerung beider Farbkanäle (FMRP, roter Kanal; hnRNP M1-M4, grüner Kanal) zeigt sich keine Co-Lokalisation. **E:** Darstellung von MAP2. **F:** Überlagerung der Kanäle (hnRNP M1-M4, grüner Kanal; MAP2, roter Kanal; DAPI-Kernfärbung, blau). Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 4+5 dargestellt.

hnRNP-H und hnRNP-M zeigen nach immunzytochemischer Färbung ein ähnliches Verteilungsmuster in Hippocampusneuronen der Ratte. Beide Proteine lassen sich ausschließlich im Zellkern nachweisen (Abbildung 21B+D und Abbildung 22B+D). Eine signifikante Co-Lokalisation mit FMRP lässt sich nicht detektieren (Abbildung 21C+22C).

3.9 PCBP1 und PCBP2 (*Poly(rC)-binding protein*)

PCBP1 und 2 finden sich in den *processing-bodies* (Fujimura et al., 2008, Fujimura et al., 2009) und haben einen Einfluss auf die Translation (Blyn et al., 1997) und auf die Transkriptionsregulation bestimmter Gene (Thakur et al., 2003, Choi et al., 2008).

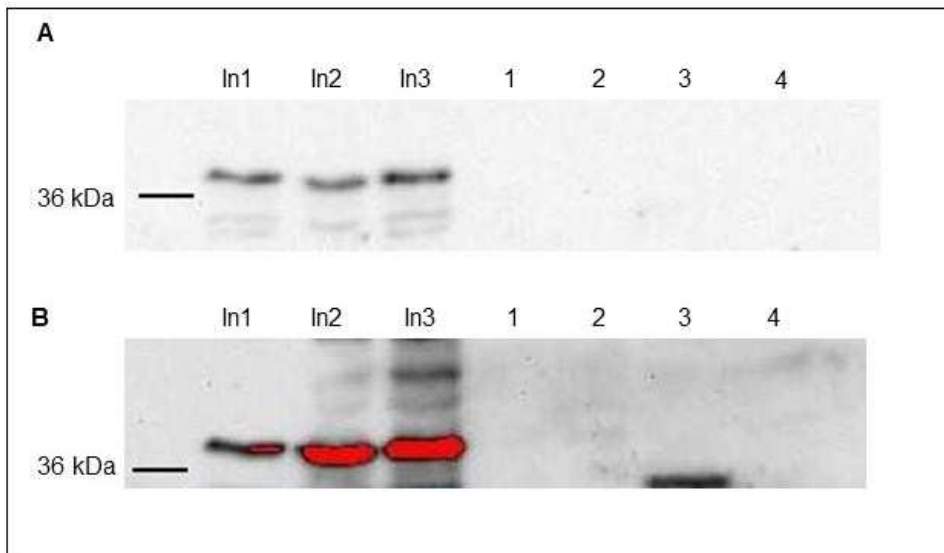


Abbildung 23A und B (B: verlängerte Belichtungszeit): Nachweis von endogenem PCBP1 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor bzw. nach Affinitätschromatographie

Proteindetektion mittels Western Blot (verwendete Antikörper und Verdünnung siehe Tabelle 4+5). Der PageRuler, prestained Protein Ladder Plus (Fermentas) diente als Größenmarker.

Nachweis des Proteins PCBP1 im Zelllysate (A+B: Spur In1, In2, In3). Nach Präzipitation lässt sich kein Protein detektieren (A+B: Spur 1-4), eine Interaktion von FMRP und PCBP1 findet nicht statt. Die Rotfärbung in B resultiert aus einer Überbelichtung. Auch hier ist kein PCBP1 zu detektieren. Weitere Erklärung siehe Abbildung 7.

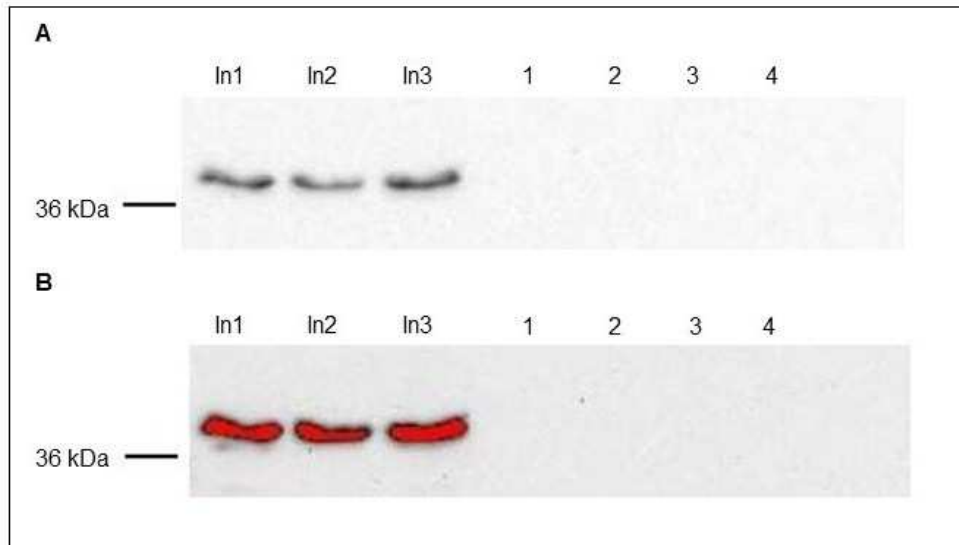


Abbildung 24A und B (B: verlängerte Belichtungszeit): Nachweis von endogenem PCBP2 in Extrakten von HEK 293-Zellen nach Transfektion vor bzw. nach Affinitätschromatographie

Im Zelllysat kann PCBP2 detektiert werden (A+B: Spur In1, In2, In3). In den Lysaten nach Präzipitation lässt sich kein Protein detektieren (A+B: Spur 1-4), es kommt zu keiner Interaktion zwischen PCBP2 und FMRP. In B kommt es durch eine Überbelichtung zur Rotfärbung der Banden. Die für den *Western Blot* verwendeten Antikörper und die Verdünnung finden sich in Tabelle 4+5. Als Größenmarker diente der PageRuler, prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 7.

In der Immundetektion nach *Western Blot* lassen sich Proteine der Größe 38 kDa und 39 kDa detektieren (Abbildung 23+24, Spur In1, In2, In3). In den Präzipitaten ist kein Protein nachweisbar (Abbildung 23+24, Spur 1, 2+4). Auch nach deutlicher Überbelichtung durch Verlängerung der Belichtungszeit (Rotfärbung der Banden in Abbildung 23B+24B) zeigen sich nur in der „Qualitätskontrolle“ Banden als Zeichen für eine spezifische Antikörperbindung an PCBP 1 und 2. In der Auswertung lässt sich somit zeigen, dass PCBP1 und 2 keine Interaktion mit FMRP eingehen.

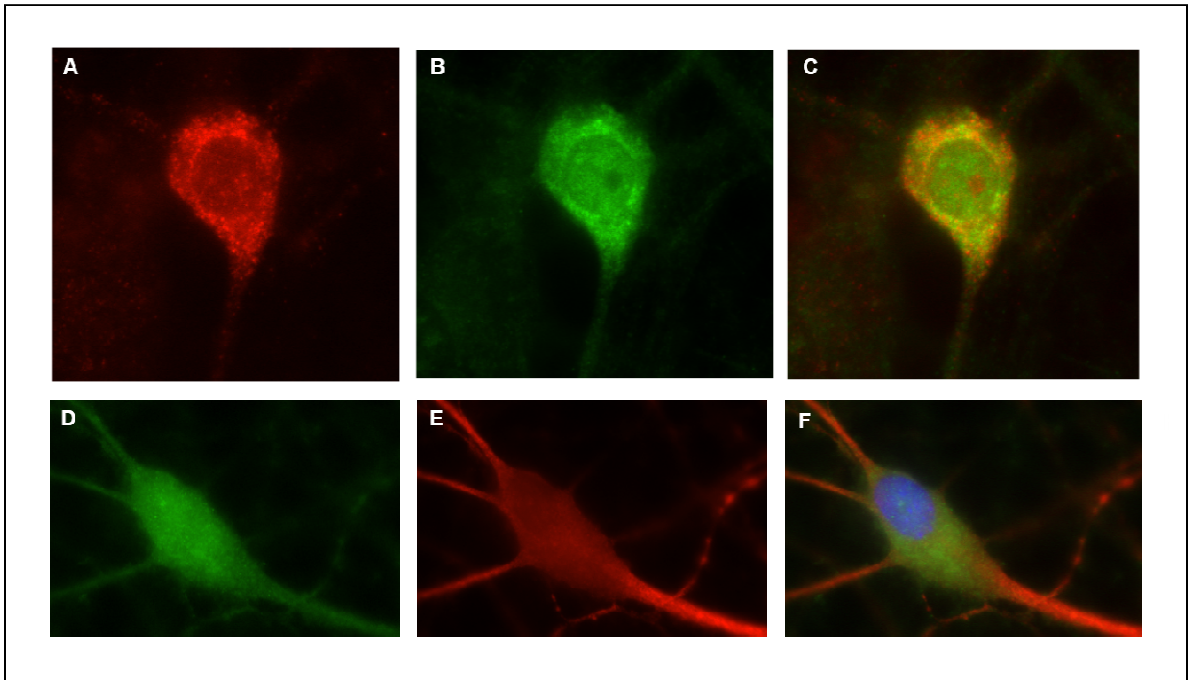


Abbildung 25: Zelluläre Verteilung von PCBP1 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte)

Proteindetektion mittels Immunzytochemie (verwendete Antikörper und Verdünnung siehe Tabelle 4+5). **A:** Darstellung des endogenen FMRP im Zytoplasma und im Nucleus. **B+D:** Das Protein PCBP1 ist im Zytoplasma und im Nucleus lokalisiert. **C:** Bei Überlagerung der Farbkanäle (FMRP, roter Kanal; PCBP1, grüner Kanal) zeigt sich eine Co-Lokalisation (Gelbfärbung) im Nucleus und im Zytoplasma. **E:** Darstellung des neuronalen Zytoskeletts mittels MAP2-Färbung. **F:** Überlagerung der Kanäle (PCBP1, grüner Kanal; MAP2, roter Kanal; DAPI-Kernfärbung, blauer Kanal).

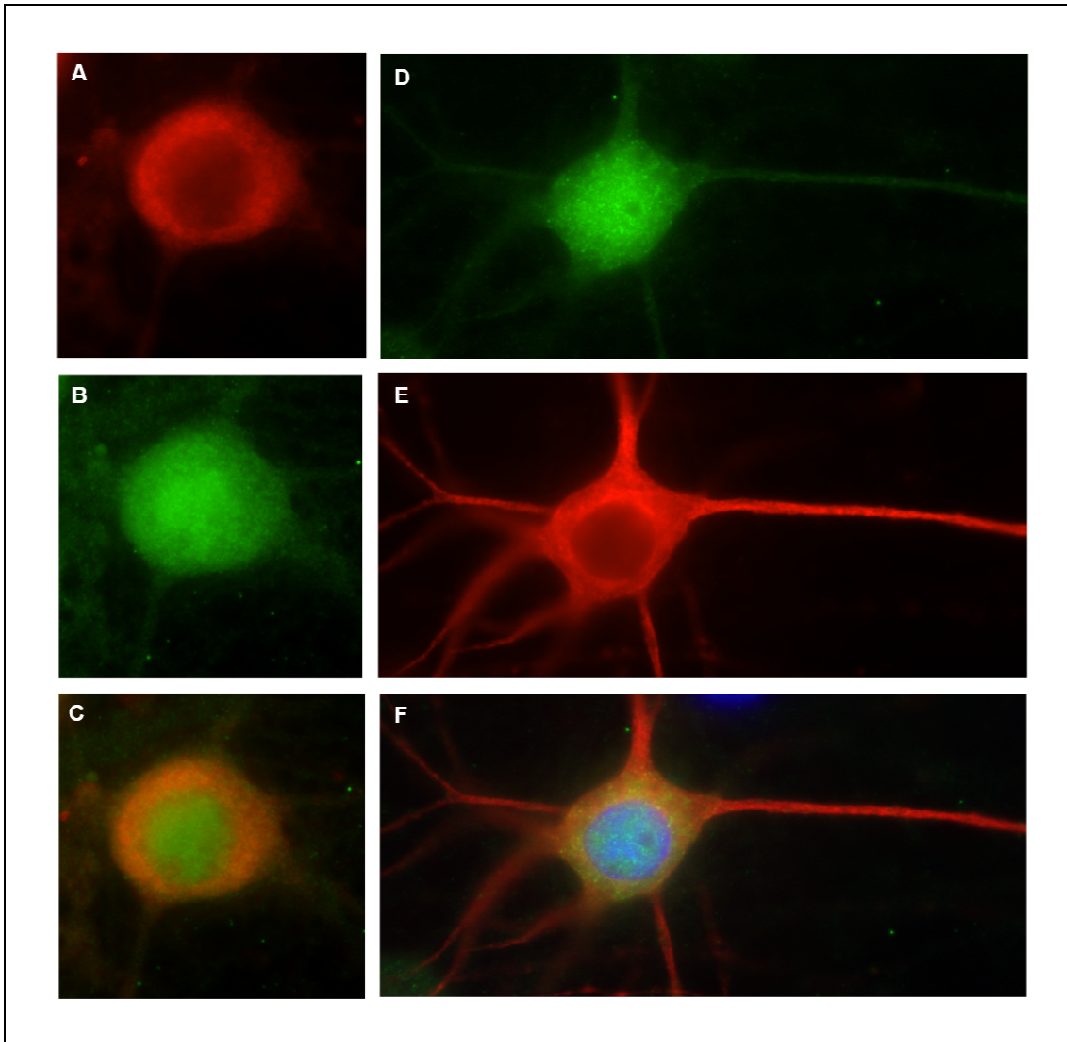


Abbildung 26: Zelluläre Verteilung von PCBP2 und Co-Lokalisation mit FMRP in Hippokampusneuronen (Ratte)

A: Immunzytochemischer Nachweis von FMRP im Zytoplasma. **B+D:** Detektion von PCBP2 im Nucleus und Zytoplasma. **C:** Eine Co-Lokalisation von FMRP und PCBP2 zeigt sich im Zytoplasma (Gelbfärbung) bei Kanalüberlagerung (FMRP, roter Kanal; PCBP2, grüner Kanal). **E:** MAP2-Detektion. **F:** Überlagerung der Kanäle (PCBP2, grüner Kanal; MAP2, roter Kanal; DAPI-Kernfärbung, blauer Kanal). Tabelle 4+5 zeigen eine Übersicht der verwendeten Antikörper und Verdünnungen.

In der immunzytochemischen Färbung von Rattenneuronen zeigen sich PCBP1 und 2 in gleichmäßiger granulärer Verteilung im Zellkern und Zytoplasma, wobei das perinukleäre Zytoplasma eine ebenso starke Fluoreszenz zeigt wie der Zellkern (Abbildung 25B+D und Abbildung 26B+D). Eine Co-Lokalisation mit FMRP lässt sich im Zytoplasma nachweisen (Gelbfärbung bei Überlagerung der Farbkanäle) (Abbildung 25C+26C). Mit PCBP1 zeigt sich auch im Nucleus eine

Co-Lokalisation (Abbildung 25C). Obwohl beide Proteine in Neuronen in identischen Abschnitten der Zellen gemeinsam vorliegen, scheinen sie nicht miteinander zu assoziieren.

Abschließend erfolgt die zusammenfassende Darstellung der oben gezeigten Ergebnisse als tabellarische Übersicht (Tabelle 6+7).

Tabelle 6: Ergebnisse *Western Blot* nach Affinitätschromatographie transfizierter HEK-Zellen

Detektiertes Protein	Spezifische Bindung an FMRP	Bindung an FMRP-I304N	RNA-abhängige Interaktion	Protein-Protein-Interaktion	Bindung an GFP
DDX1	X	-	-	X	-
EF1alpha	X	-	-	X	-
NONO	X	-	-	X	-
PRKDC	X	-	-	X	-
RPS6	X	-	-	X	-
ILF3 -90 kDa-Isoform	-	-	X	X	X
ILF3 -110 kDa-Isoform	X	-	-	X	-
hnRNP-H	-	-	-	X	X
HnRNP M1-M4	-	-	-	X	X
PCBP1	-	-	-	-	-
PCBP2	-	-	-	-	-

Tabelle 7: Ergebnisse Immunzytochemie an kultivierten Hippocampusneuronen der Ratte

Protein	Lokalisation laut www.uniprot.org	Protein-lokalisierung bei zusätzlicher MAP2-Färbung	Protein-lokalisierung bei zusätzlicher FMRP-Färbung	Co-Lokalisation mit FMRP
PRKDC	Nucleus	Zytoplasma	Zytoplasma (Granula)	Zytoplasma
NONO	Nucleus	Nucleus	Nucleus	-
ILF3	Nucleus, Nucleolus, Zytoplasma	Nucleus, Zytoplasma	Nucleus, Zytoplasma	Zytoplasma
DDX1	Zytoplasma (Granula)	Nucleus > Zytoplasma	Nucleus > Zytoplasma	Zytoplasma
EF1alpha	Zytoplasma	Zytoplasma	Zytoplasma	Zytoplasma
RPS6	Nucleolus, Zytoplasma	Nucleolus	Nucleolus > Zytoplasma	Zytoplasma
hnRNP-H	Nucleus > Zytoplasma	Nucleus	Nucleus	-
hnRNP M1-M4	Nucleus > Zytoplasma	Nucleus	Nucleus	-
PCBP1	Nucleus, Zytoplasma	Nucleus, Zytoplasma	Nucleus, Zytoplasma	Zytoplasma, wenig Nucleus
PCBP2	Nucleus, Zytoplasma	Nucleus, Zytoplasma	Nucleus, Zytoplasma	Zytoplasma

4 Diskussion

Der funktionelle Verlust des Proteins FMRP bewirkt den Phänotyp des Fragilen X Syndroms (Gedeon et al., 1992, Wohrle et al., 1992, De Boulle et al., 1993). FMRP ist ein RNA-bindendes Protein (Ashley et al., 1993a). Vermutlich spielt es präferentiell bei der Regulation der Translation eine Rolle (Khandjian et al., 1996, Feng et al., 1997a). Insbesondere scheint es als Repressor der Translation zu fungieren (Laggerbauer et al., 2001, Darnell et al., 2011). Einige Interaktionspartner von FMRP sind bereits identifiziert (siehe 1.4). Trotzdem ist die genaue molekulare Wirkweise von FMRP in Zellen bislang unklar. Ziel dieser Arbeit ist, zu validieren, ob einige der putativen Interaktionspartner tatsächlich in Zellen mit FMRP assoziiert sind und ob sie ein unterschiedliches Bindungsverhalten gegenüber der mutierten Proteinform FMRP-I304N zeigen. Aus den Ergebnissen sollen anhand der Charakterisierung der Interaktionspartner Hypothesen über die Funktion von FMRP entwickelt werden. Dies ist notwendig als Grundlage für weitere Forschung bezüglich therapeutischer Ansätze beim Fragilen X-Syndrom.

In der Arbeitsgruppe Kindler wurde eine GFP-*Trap*-Affinitätschromatographie (siehe 2.2.3.1) mit FMRP-EGFP und eine anschließende Analyse der im Präzipitat vorhandenen Proteine mittels Massenspektrometrie durchgeführt. Es konnten 50 Proteine identifiziert werden, die als mögliche Interaktionspartner in Frage kommen. Einige dieser Proteine verfügen über eine DNA- und/oder RNA-Bindungsfähigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurden 10 Proteine dieser Gruppe auf ihr Interaktionsmuster mit FMRP untersucht, da vermutet wurde, dass sich hierunter Proteine mit wichtigem regulatorischen Einfluss befinden könnten. Die untersuchten Proteine können anhand ihrer molekularen Funktion in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (siehe Abbildung 27). Mittels immunzytochemischer Färbungen von Rattenneuronen konnten sie intrazellulär lokalisiert werden.

In einer immunzytochemischen Färbung von endogenem FMRP in primären Hippokampusneuronen der Ratte zeigte sich die Lokalisierung von FMRP primär im Zytosol des Zellkörpers und in den Dendriten, mit leicht granulärem

Verteilungsmuster. In einigen Neuronen ist FMRP jedoch auch im Nucleus nachweisbar. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen (Devys et al., 1993, Feng et al., 1997b, Tamanini et al., 1997). Prinzipiell ist aufgrund der beschriebenen intrazellulären Lokalisationen des FMRP davon auszugehen, dass putative Interaktionspartner des FMRP im Zytosol zu finden sein könnten. In der vorliegenden Arbeit konnten zusätzlich auch Interaktionspartner von FMRP ermittelt werden, deren Lokalisation primär der Nucleus ist, bzw. die sich als „Pendel“-Proteine zwischen Nucleus und Zytoplasma hin und her bewegen.

Es folgt eine Betrachtung aller untersuchten Proteine, sowie ihre funktionelle Einordnung und mögliche molekulare Interaktion mit FMRP. Ihre Besprechung erfolgt anhand einer Einteilung in Gruppen abgeleitet von der intrazellulären Funktion. Die Proteine PRKDC, NONO und ILF3 sind an der Regulation der Transkription beteiligt, während die Proteine DDX1, EF1alpha und RPS6 in die Translationsregulation involviert sind. Zusätzlich lässt sich eine übergreifende dritte Gruppe bilden, die Proteine beinhaltet, die „Pendel“-Proteine sind und vermutlich zusätzlich für den mRNA-Transport bedeutsam sind. Hierzu zählen die Proteine NONO, ILF3 und DDX1.

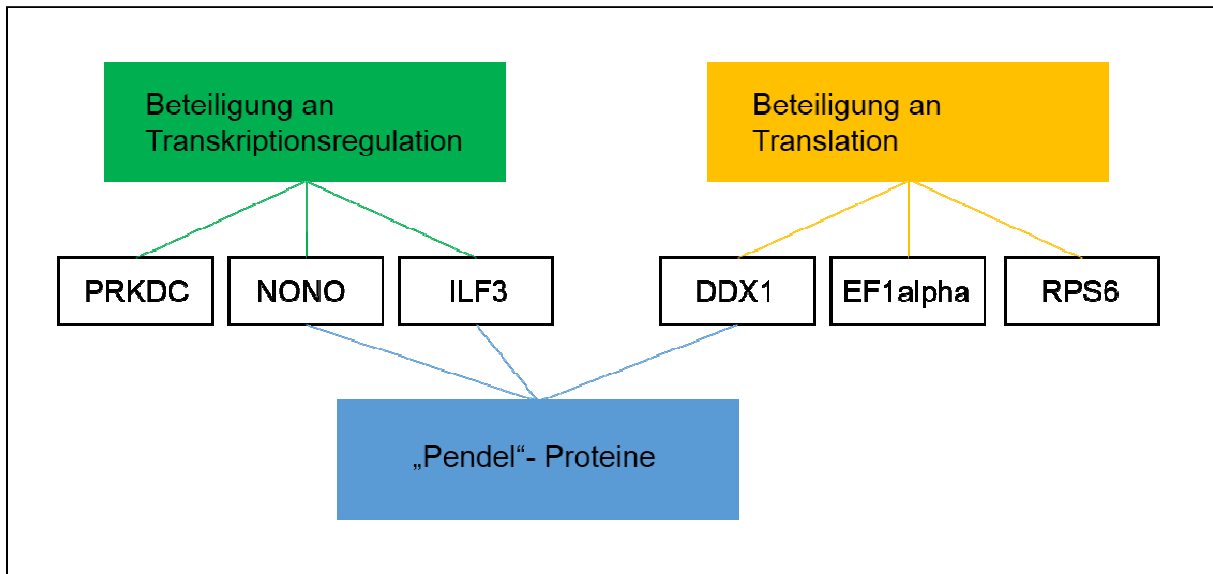


Abbildung 27: Einteilung der Interaktionspartner von FMRP nach ihrer molekularen Funktionsweise.

Die Proteine PRKDC, NONO und ILF3 sind an der Transkriptionsregulation beteiligt, die Proteine DDX1, EF1alpha und RPS6 in die Translation involviert. Die Proteine NONO, ILF3 und DDX1 fungieren zusätzlich als „Pendel“-Proteine.

Das Bindungsverhalten aller ermittelten Interaktionspartner erfolgt RNA-unabhängig über direkte oder indirekte Protein-Protein Interaktionen. Bei keinem der untersuchten Proteine zeigte sich aufgrund des Aminosäureaustausches in der KH2-Domäne von FMRP-I304N im Gegensatz zum Wildtypprotein eine veränderte Interaktion. Somit liefern die untersuchten Proteine keinen Hinweis auf die molekulare Ursache der Pathologie des Fragilen X Syndroms.

Proteine mit Beteiligung an der Transkriptionsregulation

PRKDC

PRKDC ist die katalytische Untereinheit einer DNA-abhängigen nukleären Proteinkinase (DNA-PK). Die zweite Komponente dieser Kinase ist das Protein XRCC6, das die DNA-bindende Komponente bildet. Beide Untereinheiten interagieren über eine Proteinbindung (Gottlieb and Jackson, 1993). XRCC6 konnte in der AG Kindler bereits als Interaktionspartner von FMRP identifiziert werden. Die DNA-PK phosphoryliert Transkriptionsfaktoren in Anwesenheit von

Doppelstrang-DNA und verändert so deren Aktivität (Gottlieb and Jackson, 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte PRKDC ebenfalls als spezifischer Interaktionspartner von FMRP identifiziert werden. Die Interaktion erfolgt über eine indirekte oder direkte Protein-Protein-Bindung, da sie auch nach RNase-Behandlung fortbesteht. Es liegt die Vermutung nahe, dass regulatorische Proteine mit PRKDC als katalytischer Untereinheit eine Interaktion eingehen und somit eine Veränderung der Transkription bewirken. Es ist zu vermuten, dass FMRP als regulatorisches Protein in dieser Art und Weise mit dem Protein PRKDC interagiert und die Transkription beeinflusst. Somit hätte das FMRP nicht nur auf die Translation, sondern auch auf die Transkription einen Einfluss. In der immunzytochemischen Färbung wurde das PRKDC im Zytoplasma mit granulärem Verteilungsmuster lokalisiert, nukleär war kaum PRKDC darstellbar. Dies ist aufgrund der beschriebenen Proteinfunktion als Interaktionspartner von Transkriptionsfaktoren ein unerwartetes Ergebnis, findet die Transkription bei Eukaryonten doch im Zellkern statt (Alberts et al., 2008). Es bleibt zu untersuchen, ob PRKDC in Bindung an FMRP eine zusätzliche bisher unbekannte Funktion innehat, die im Zytoplasma lokalisiert ist. Aufgrund der Detektion beider Proteine im Nucleus ist ein Zusammenspiel in der Transkriptionsregulation möglich. Wegen der deutlichen Co-Lokalisation im Zytoplasma ist eine gemeinsame Funktion z.B. in der Regulation der Translation anzunehmen. Bislang ist aber unklar, ob PRKDC bei der Translationskontrolle von Bedeutung ist.

NONO

Das untersuchte Protein NONO ist ein DNA- und RNA-bindendes Protein (Yang et al., 1993), das in die konservierte Familie der DBHS (*Drosophila behavior/human splicing*)-Proteine gehört (Dong et al., 1993). Auf Ebene der Transkription wirkt NONO aktivierend, indem es u.a. an Promotoren bindet (Basu et al., 1997, Dong et al., 2007, Park et al., 2013). Eine weitere Funktion von NONO ist die Retention von überexprimierter mRNA im Nucleus und die Kontrolle des Exports von selektiv editierter mRNA (Zhang and Carmichael, 2001). NONO konnte in der vorliegenden Arbeit als spezifischer Interaktionspartner von FMRP identifiziert werden. Die Interaktion erfolgt mittels direkter oder indirekter Protein-Protein-Interaktion. Dass

FMRP eine entscheidende Rolle für den RNA-Transportprozess aus dem Nucleus ins Zytoplasma spielt, wird seit einigen Jahren angenommen (Eberhart et al. 1996). Eine Interaktion von FMRP mit dem Protein NONO ist vor diesem Hintergrund folglich gut möglich und könnte während dieses Transportprozesses erfolgen. Dass sowohl FMRP als auch NONO in RNA-transportierendem Granula gefunden wurden (Kanai et al., 2004) unterstützt diese Hypothese. In der immunzytochemischen Färbung lässt sich das Protein NONO ausschließlich im Zellkern detektieren, eine deutliche Co-Lokalisation von FMRP und NONO ist nicht nachweisbar. Möglicherweise kommt es also nur zu einer transienten Interaktion im Zellkern. Bemerkenswert ist, dass es bei Fehlen von NONO sowohl bei Menschen, als auch bei *NONO-Knockout*-Mäusen zu einer intellektuellen Beeinträchtigung und erhöhter Schüchternheit/Ängstlichkeit kommt (Mircsof et al., 2015), Symptome, die (wie oben beschrieben) auch beim Fragilen X-Syndrom zu finden sind. Ob das Fehlen von FMRP einen Einfluss auf die zelluläre Konzentration von NONO hat und somit zu dieser Symptomatik beiträgt, wäre eine interessante weiterführende Fragestellung.

ILF3

ILF3 ist ein dsRNA-bindendes Protein (Patel et al., 1999), dessen Funktion in einer Regulation der Genexpression (Reichman et al., 2002, Reichman and Mathews, 2003, Reichman et al., 2003, Nakadai et al., 2015) und einer Stabilisierung von mRNAs besteht (Shim et al., 2002). Die Beeinflussung der Transkription erfolgt als Coaktivator, u.a. im Komplex mit ILF2, durch direkte Bindung an Enhancer und Promotoren (Nakadai et al., 2015) und kann sowohl aktivierend als auch supprimierend wirken (Reichman et al., 2002, Reichman and Mathews, 2003). Es gibt verschiedene Isoformen des Proteins, die durch alternatives Spleißen entstehen (Duchange et al., 2000). Für ILF3 und seine Spleißvarianten existieren eine Vielzahl unterschiedlicher Namen (Castella et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden 3 Proteine unterschiedlicher Größe detektiert. Die größte Proteinisoform (ILF3-110 kDa) zeigte eine spezifische Interaktion mit FMRP über eine Proteinbindung. Die ILF3-90 kDa-Isoform zeigte keine spezifische Bindung an FMRP. Eine schwache Interaktion ist aber dennoch

zu vermuten, da sie in Anwesenheit von FMRP verstärkt präzipitiert wird. Eine Interaktion von ILF3 mit FMRP findet möglicherweise während des mRNA-Transports aus dem Nucleus ins Zytoplasma statt. Hierzu passend, konnte in der Literatur gezeigt werden, dass ILF3 in die Retention von mRNA im Zellkern und in die Umverteilung nukleärer mRNA ins Zytoplasma in Assoziation an RNP-Komplexe involviert ist (Pfeifer et al., 2008). Auch der immunzytochemische Nachweis einer Co-Lokalisation von FMRP mit ILF3 im Nucleus und Zytoplasma unterstützt diese Hypothese. Inwiefern FMRP möglicherweise auch auf die unmittelbare Transkriptionsregulation über ILF3 einen Einfluss hat, wäre eine interessante Fragestellung weiterer Untersuchungen.

Proteine mit Beteiligung an der Translation

DDX1, EF1alpha und RPS6

Im Folgenden werden die untersuchten Proteine DDX1, EF1alpha und RPS6 gemeinsam besprochen, da alle drei im Rahmen der zellulären Translation durch Interaktion mit Ribosomen beteiligt sind. Grundsätzlich erfolgt die Regulation der Translation über Inhibition der Initiation oder Inhibition der Elongation (Gebauer and Hentze, 2004). Wie bereits beschrieben, scheint FMRP einen Einfluss auf die Regulation der Proteinsynthese zu besitzen, indem es inhibitorisch wirkt (Laggerbauer et al., 2001). Inwiefern hier möglicherweise eine Interaktion mit DDX1, EF1alpha und RPS6 erfolgt, wird im Folgenden erläutert.

DDX1 gehört zur Familie der DEAD-box Proteine (Godbout and Squire, 1993), die nach ihrem konservierten Bereich Asp-Glu-Ala-Asp (D-E-A-D) benannt sind (Linder et al., 1989). DEAD-box Proteine sind RNA-Helikasen und in der Lage Basenpaarungen in doppelsträngigen RNA-Abschnitten zu spalten (Tanner and Linder, 2001). DDX1 bindet poly A-RNA und ist somit vermutlich an der 3' Prozessierung von pre-mRNA beteiligt (Chen et al., 2002). Als Bestandteil von zellulären RNA-Granula-Komplexen ist es vermutlich in den nukleozytoplasmatischen RNA-Transport involviert (Perez-Gonzalez et al., 2014). DDX1 konnte in dieser Arbeit als spezifischer Interaktionspartner von FMRP identifiziert werden. Die Interaktion erfolgt über eine Proteinbindung. In der

Literatur wurde DDX1 u.a. in Komplexen mit DDX3 und in Co-Lokalisation mit Ribosomen sowohl in Dendriten, als auch in Axonen gefunden (Miller et al., 2009). Es ist vorstellbar, dass DDX1 sowohl eine nukleäre als auch eine zytosolische Funktion besitzt. Möglicherweise kommt es zwischen FMRP und DDX1 im Rahmen der Translation an ribosomenbeinhaltenden Komplexen zu einer Assoziation. Hierzu passend konnte in der vorliegenden Arbeit eine Co-Lokalisation von FMRP und DDX1 im Zytosol nachgewiesen werden. Unabhängig davon wurde DDX1 auch im Zellkern detektiert.

EF1alpha ist ein GTP-abhängiger Elongationsfaktor. Er hat eine katalytische Funktion, bindet aminoacyl-tRNAs und vermittelt eine Assoziation der tRNA mit der A-Position der Ribosomen. Somit ist er essentiell für die Elongation der Proteinsynthese (Miller and Weissbach, 1977). Ribosomen bestehen aus rRNA und ribosomalen Proteinen und setzen sich aus einer großen und einer kleinen Untereinheit zusammen (Klinge et al., 2012, Wilson and Doudna Cate, 2012). Das ribosomale Protein S6 (RPS6) ist Teil der 40S-Untereinheit in Ribosomen (Robledo et al., 2008). Ruvinsky et al. (Ruvinsky et al., 2005) konnte zeigen, dass RPS6 vermutlich eine Funktion im Bereich von Zellwachstum und Proliferation, sowie einen Einfluss auf die generelle Proteinbiosynthese hat. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl EF1alpha, als auch RPS6 spezifisch an FMRP binden. Beide zeigten eine Interaktion über eine Proteinbindung und interagierten auch mit FMRP-I304N. Das vorliegende Ergebnis stützt die bereits in der Literatur vermutete Interaktion von FMRP mit EF1alpha, wobei FMRP vermutlich einen Einfluss auf die Syntheserate des zellulären EF1alpha besitzt und auch hier als negativer Regulator wirkt: In Abwesenheit von FMRP kommt es zu einer erhöhten Konzentration von EF1alpha, während die Zahl der zugehörigen mRNAs konstant bleibt (Sung et al., 2003). Diese Beobachtung sowie die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass FMRP insbesondere in der Translationsregulation eine große Rolle spielt, und in diesem Rahmen mit EF1alpha und RPS6 interagiert. Ein weiteres Indiz für eine Interaktion von FMRP mit EF1alpha und RPS6 zeigt sich in der Co-Lokalisation von FMRP und EF1alpha im Zytosol mit Aussparung der Dendriten, sowie mit RPS6 in perinukleären Granula, passend zur zellulären Lokalisation der Proteinsynthese an den Ribosomen. RPS6 war zusätzlich ebenfalls verstärkt im Nucleus in granulären

Verdichtungen nachweisbar, vermutlich ist dies das Korrelat für die Nucleoli als Bildungsort der Ribosomen.

Zusammengefasst bestärken die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse einer Interaktion von FMRP mit DDX1, EF1alpha und RPS6 die Hypothese, dass die Funktion von FMRP in der Translationsregulation zu liegen scheint.

Proteine ohne Interaktion mit FMRP

hnRNP-H, hnRNP M1-M4, PCBP1 und PCBP2

hnRNP-H und hnRNP-M1-M4 zeigen in der vorliegenden Arbeit keine spezifische Interaktion mit FMRP. Eine Interaktion mit FMRP ist aber dennoch möglich, da der Proteinnachweis in der Kontrollfraktion deutlich schwächer ausgeprägt ist als bei der Wildtyp- und der Mutationsfraktion. Um dies zu klären, müssten weitere Tests z.B. mit einem anderen Fusionsprotein, das kein EGFP enthält, und einer anderen Affinitätsmatrix erfolgen. Es könnte beispielsweise auch die Immunpräzipitation des endogenen FMRP zur Klärung beitragen. Die eigenen Ergebnisse deuten somit nicht auf eine Assoziation von hnRNP und FMRP hin. Auch in der subzellulären Lokalisation von hnRNP-H, -M1-M4 und FMRP zeigte sich keine Co-Lokalisation.

Bei den Proteinen PCBP1 und PCBP2 konnte in der Proteindetektion nach *Western Blot* kein Protein detektiert werden. Somit wurde keine Interaktion von PCBP1 und 2 mit FMRP gefunden. Für weitere Versuche sind diese Proteine also von untergeordnetem Interesse.

Fazit

Der Nachweis einer Interaktion zwischen FMRP und Proteinen, die am Transport von mRNA aus dem Nucleus ins Zytoplasma und an unmittelbaren Vorgängen der Translation beteiligt sind, unterstützt das bereits beschriebene Modell von Bagni und Greenough (Bagni and Greenough, 2005), dass eine Interaktion zwischen FMRP und mRNAs bereits im Zellkern erfolgt, gefolgt von einem Export ins

Zytoplasma als Teil eines RNP-Komplexes. In Assoziation mit Ribosomen findet dann die Translation statt (Bagni and Greenough, 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich somit gut in die in der Literatur bereits beschriebenen Ergebnisse einordnen. FMRP scheint eine wichtige Rolle im RNA-Stoffwechsel der Zelle zu spielen. Darüber hinaus konnte diese Arbeit zeigen, dass FMRP vermutlich zusätzlich Einfluss auf die Transkription ausübt, möglicherweise über eine Interaktion mit PRKDC und ILF3.

Die vorliegende Arbeit kann als Grundlage für weitere Forschung dienen. Die als spezifisch ermittelten Interaktionspartner können weiter gezielt untersucht werden. Mögliche Ansätze für weitere Untersuchungen können sein:

1. Interessant wäre ein Proteinnachweis mittels *Western Blot* mit Zellextrakten, die getrennt aus Nucleus und Zytoplasma gewonnen wurden. So wäre es eventuell möglich, den subzellulären Ort der Interaktion mit FMRP weiter einzugrenzen.
2. Des Weiteren wäre es interessant, die Art und Dauer der Bindung mit FMRP weiter zu charakterisieren. Ist diese nur kurzzeitig wie bei dem Protein NONO angenommen und nur für einen bestimmten Schritt im Rahmen der Translation oder erfolgt die Bindung dauerhaft? Und liegt eine direkte Bindung der untersuchten Proteine mit FMRP vor, oder gibt es Mediatorproteine/RNAs oder Protein/RNA-Gruppen, wie z.B. die Ribosomen, in deren Kontext eine Interaktion stattfindet?
3. Weitere Untersuchungen im Hinblick auf eine Transkriptionsregulation von FMRP.

Die in dieser Arbeit beschriebene Technik der Ermittlung putativer Interaktionspartner und der Nachweis einer Interaktion mit FMRP sind technisch gut durchführbar und zur Lösung der gewählten Fragestellung nützlich. Es konnte gut zwischen tatsächlichen Interaktionspartnern (DDX1, EF1alpha, NONO, PRKDC, RPS6 und ILF3-110kDa) und Proteinen ohne Interaktion (ILF3-90kDa, hnRNP-H und -M, PCBP1 und PCBP2) unterschieden werden. Die ermittelten Interaktionspartner zeigten jedoch keinen Unterschied im Interaktionsmuster mit FMRP und FMRP-I304N. Die Untersuchungen liefern somit keinen Hinweis auf den molekularen Mechanismus der Pathologie des Fragilen X Syndroms.

5 Zusammenfassung

Das Fragile X Syndrom ist eine der häufigsten Ursachen für genetisch bedingte intellektuelle Beeinträchtigung. Es handelt sich um eine Trinukleotidexpansionserkrankung, die in einem Ausfall des betroffenen Gens *FMR1* resultiert. Das Genprodukt FMRP wird in den betroffenen Individuen nicht gebildet. Es zeigt sich interindividuell ein sehr variabler Symptomenkomplex mit somatischen Auffälligkeiten, kognitiven Beeinträchtigungen und Verhaltensauffälligkeiten. Auch bei einer einzelnen Punktmutation im *FMR1*-Gen, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 304 des Proteins (FMRP-I304N) führt, zeigt sich das klinische Bild des Fragilen X Syndroms. Das Protein FMRP wird in diesem Fall exprimiert, allerdings in veränderter Form. Es wird vermutet, dass FMRP in den subzellulären Transport, die Stabilität und die Translation von neuronalen mRNAs involviert ist. Inwiefern der Ausfall von FMRP zur Symptomatik des Fragilen X Syndroms führt, ist Ziel zahlreicher Forschungsarbeiten und konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Auch fehlen bisher erfolgreiche therapeutische Optionen. Um ein besseres Verständnis bezüglich der molekularen Wirkweise von FMRP zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit nach Interaktionspartnern von FMRP und seiner veränderten Proteinvariante FMRP-I304N gesucht. Hierfür wurden Fusionsproteine in HEK 293-Zellen generiert, die mittels Affinitätschromatographie isoliert wurden. Im *Western Blot* konnte ihr Interaktionsmuster, sowie die Art der Bindung mit FMRP verifiziert werden. Die Proteine PRKDC, NONO, ILF3 (110kDa-Isoform), DDX1, EF1alpha und RPS6 konnten als Interaktionspartner identifiziert werden. Keines der untersuchten Proteine zeigt gegenüber der Proteinvariante FMRP-I304N ein verändertes Bindungsmuster. Die Untersuchungen liefern somit keinen Hinweis auf den molekularen Pathomechanismus der Erkrankung. Die Analyse der bisher bekannten Funktionen der Interaktionspartner unterstützt die Vermutung einer wichtigen Funktion von FMRP im RNA-Metabolismus von Neuronen. Zusätzlich konnte die Möglichkeit einer Regulation der Transkription über PRKDC und ILF3 formuliert werden. Zur Detektion des genauen subzellulären Interaktionsortes zwischen FMRP und seinen Interaktionspartnern erfolgte die immunzytochemische Färbung von embryonalen Hippokampusneuronen der

Ratte. Es zeigten sich Co-Lokalisationen im Zytoplasma des Zellkörpers, in den Dendriten und im Zellkern. Es ist also von einer ubiquitären Funktion von FMRP in allen neuronalen Zellkompartimenten auszugehen.

Abstract

The Fragile X Syndrome is one of the most common inherited forms of intellectual disability. It is caused by a trinucleotide repeat expansion and results in the functional loss of the *FMR1* gene. Thus, the gene product FMRP is not synthesized. Affected individuals present with a variable range of symptoms, including different somatic abnormalities, cognitive impairment and behavioural disorder. Interestingly, a single point mutation in the *FMR1* gene that leads to an amino acid change in position 304 of the protein (FMRP-I304N) also causes Fragile X Syndrome, indicating that the modified gene product is functionally impaired. It is assumed that FMRP plays a role in the subcellular transport, stability and translation of neuronal mRNAs. However, it is still unclear why the functional loss of FMRP results in the specific symptoms of Fragile X Syndrome. Furthermore, effective treatment for patients suffering from the Fragile X Syndrome is not yet available. This study identifies protein interaction partners of FMRP to better understand its molecular function. Therefore, FMRP and FMRP-I304N fusion proteins were generated in HEK 293 cells and isolated by affinity chromatography. Individual protein interaction patterns and binding modes were analysed via Western blotting. The proteins PRKDC, NONO, ILF3 (110kDa-isoform), DDX1, EF1alpha and RPS6 were identified as FMRP associated proteins, which also efficiently bind to FMRP-I304N, thus not providing a hint regarding the molecular pathomechanism of the illness. Reported functions of the identified interaction partners suggest that FMRP plays an important role in RNA metabolism in neurons. Embryonic hippocampal rat neurons were utilized to determine the subcellular distribution of putative interaction partners via immunocytochemistry. For individual proteins, a co-localisation with FMRP was shown in the cytoplasm of the cell body, in dendrites and in nucleus, respectively. Therefore, it can be assumed that FMRP is involved in distinct steps of RNA metabolism proceeding in different cell compartments, such as transcription/pre-

mRNA processing (nucleus) and mRNA translation and stability (cytosol), respectively.

6 Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-Propionsäure
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CYFIP	<i>cytoplasmic FMRP-interacting protein 1</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBHS	<i>Drosophila behavior/human splicing</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDX1/5/17	<i>DEAD box protein 1/5/17</i>
DEAD	Aminosäuresequenz D-E-A-D (Asparaginsäure-Glutaminsäure-Alanin- Asparaginsäure)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1alpha	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FMR1	<i>fragile X linked mental retardation type 1</i>
FMRP	<i>fragile X mental retardation protein</i>
FXRP1/2	<i>fragile X related protein 1/2</i>
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
g	Erdschwerebeschleunigung
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
hnRNP -H/-M	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein- H/-M</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
I	Isoleucin
ILF3	<i>interleucin enhancer binding factor 3</i>
IQ	Intelligenzquotient
kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
KH	<i>hnRNP-K homology</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LTD	<i>long-term depression</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i>
mA	Miliampere
M	Molar, Mol/Liter
mM	Milimolar
mm	Milimeter
ml	Mililiter
MAP2	<i>microtubule associated protein 2</i>
mGluR	<i>metabotropic glutamate receptor</i>
min	Minute
MMP9	<i>matrix metalloproteinase 9</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein</i>
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
N	Asparagin
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nm	Nanometer
NONO	<i>non-POU domain containing, octamer-binding protein</i>
NUFIP	<i>nuclear FMRP-interacting protein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphat buffered saline mit Tween</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Wasserstoff-Ionen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RGG	Arginin-Glycin-Glycin <i>repeats</i>
RNA	<i>riconucleic acid</i>
RNAse	Ribonuklease

RNP	<i>ribonucleoprotein</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPS6	<i>40S ribosomal protein S6</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
PCBP1/2	<i>poly(rC) binding protein 1/2</i>
PRKDC	<i>protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TD	<i>tudor domain</i>
TDRD3	<i>tudor domain containing protein 3</i>
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
XRCC6	<i>X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 6</i>
z.B.	zum Beispiel

7 Literaturverzeichnis

- ADINOLFI, S., RAMOS, A., MARTIN, S. R., DAL PIAZ, F., PUCCI, P., BARDONI, B., MANDEL, J. L. & PASTORE, A. 2003. The N-terminus of the fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding. *Biochemistry*, 42(35), 10437-44.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. 2008. How Cells Read the Genom: From DNA to Protein. *In: ANDERSEN, M. & GRANUM, S. (eds.) Molecular Biology of the Cell*. 5th Edition ed. New York, USA Garland Science, Taylor & Francis Group.331.
- ANTAR, L. N., DICTENBERG, J. B., PLOCINIAC, M., AFROZ, R. & BASSELL, G. J. 2005. Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes Brain Behav*, 4(6), 350-9.
- ASHLEY, C. T., JR., WILKINSON, K. D., REINES, D. & WARREN, S. T. 1993a. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science*, 262(5133), 563-6.
- ASHLEY, C. T., SUTCLIFFE, J. S., KUNST, C. B., LEINER, H. A., EICHLER, E. E., NELSON, D. L. & WARREN, S. T. 1993b. Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet*, 4(3), 244-51.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. & STRUHL, K. 1999. *Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from current protocols in molecular biology*, 4th edition, New York, John Wiley & Sons.
- BAGNI, C. & GREENOUGH, W. T. 2005. From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci*, 6(5), 376-87.
- BAGNI, C., TASSONE, F., NERI, G. & HAGERMAN, R. 2012. Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *J Clin Invest*, 122(12), 4314-22.
- BANKER, G. & GOSLIN, K. 1998. Culturing nerve cells. 2nd edition, Cambridge, Massachusetts MIT Press. 339-370.
- BARDONI, B., WILLEMSSEN, R., WEILER, I. J., SCHENCK, A., SEVERIJNEN, L. A., HINDELANG, C., LALLI, E. & MANDEL, J. L. 2003. NUFIP1 (nuclear FMRP interacting protein 1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein associated with active synaptoneuroosomes. *Exp Cell Res*, 289(1), 95-107.
- BASU, A., DONG, B., KRAINER, A. R. & HOWE, C. C. 1997. The intracisternal A-particle proximal enhancer-binding protein activates transcription and is identical to the RNA- and DNA-binding protein p54nrb/NonO. *Mol Cell Biol*, 17(2), 677-86.

- BAUMGARDNER, T. L., REISS, A. L., FREUND, L. S. & ABRAMS, M. T. 1995. Specification of the neurobehavioral phenotype in males with fragile X syndrome. *Pediatrics*, 95(5), 744-52.
- BEAR, M. F. & MALENKA, R. C. 1994. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology*, 4(3), 389-399.
- BEAR, M. F., HUBER, K. M. & WARREN, S. T. 2004. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci*, 27(7), 370-7.
- BERRY-KRAVIS, E., KRAUSE, S. E., BLOCK, S. S., GUTER, S., WUU, J., LEURGANS, S., DECLE, P., POTANOS, K., COOK, E., SALT, J., MAINO, D., WEINBERG, D., LARA, R., JARDINI, T., COGSWELL, J., JOHNSON, S. A. & HAGERMAN, R. 2006. Effect of CX516, an AMPA-modulating compound, on cognition and behavior in fragile X syndrome: a controlled trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 16(5), 525-40.
- BLYN, L. B., TOWNER, J. S., SEMLER, B. L. & EHRENFELD, E. 1997. Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *J Virol*, 71(8), 6243-6.
- CASTELLA, S., BERNARD, R., CORNO, M., FRADIN, A. & LARCHER, J. C. 2015. Iif3 and NF90 functions in RNA biology. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 6(2), 243-56.
- CHEN, H. C., LIN, W. C., TSAY, Y. G., LEE, S. C. & CHANG, C. J. 2002. An RNA helicase, DDX1, interacting with poly(A) RNA and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *J Biol Chem*, 277(43), 40403-9.
- CHIURAZZI, P., POMPONI, M. G., WILLEMSSEN, R., OOSTRA, B. A. & NERI, G. 1998. In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, 7(1), 109-13.
- CHOI, H. S., SONG, K. Y., HWANG, C. K., KIM, C. S., LAW, P. Y., WEI, L. N. & LOH, H. H. 2008. A proteomics approach for identification of single strand DNA-binding proteins involved in transcriptional regulation of mouse mu opioid receptor gene. *Mol Cell Proteomics*, 7(8), 1517-29.
- D'HULST, C., DE GEEST, N., REEVE, S. P., VAN DAM, D., DE DEYN, P. P., HASSAN, B. A. & KOOY, R. F. 2006. Decreased expression of the GABAA receptor in fragile X syndrome. *Brain Res*, 1121(1), 238-45.
- DARNELL, J. C., MOSTOVETSKY, O. & DARNELL, R. B. 2005. FMRP RNA targets: identification and validation. *Genes Brain Behav*, 4(6), 341-9.
- DARNELL, J. C., VAN DRIESCHE, S. J., ZHANG, C., HUNG, K. Y., MELE, A., FRASER, C. E., STONE, E. F., CHEN, C., FAK, J. J., CHI, S. W., LICATALOSI, D. D., RICHTER, J. D. & DARNELL, R. B. 2011. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, 146(2), 247-61.
- DATAR, K. V., DREYFUSS, G. & SWANSON, M. S. 1993. The human hnRNP M proteins: identification of a methionine/arginine-rich repeat motif in ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res*, 21(3), 439-46.

- DE BOULLE, K., VERKERK, A. J., REYNIERS, E., VITS, L., HENDRICKX, J., VAN ROY, B., VAN DEN BOS, F., DE GRAAFF, E., OOSTRA, B. A. & WILLEMS, P. J. 1993. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet*, 3(1), 31-5.
- DE RUBEIS, S., PASCIUTO, E., LI, K. W., FERNANDEZ, E., DI MARINO, D., BUZZI, A., OSTROFF, L. E., KLANN, E., ZWARTKRUIS, F. J., KOMIYAMA, N. H., GRANT, S. G., POUJOL, C., CHOQUET, D., ACHSEL, T., POSTHUMA, D., SMIT, A. B. & BAGNI, C. 2013. CYFIP1 coordinates mRNA translation and cytoskeleton remodeling to ensure proper dendritic spine formation. *Neuron*, 79(6), 1169-82.
- DE VRIES, B. B., ROBINSON, H., STOLTE-DIJKSTRA, I., TJON PIAN GI, C. V., DIJKSTRA, P. F., VAN DOORN, J., HALLEY, D. J., OOSTRA, B. A., TURNER, G. & NIERMEIJER, M. F. 1995. General overgrowth in the fragile X syndrome: variability in the phenotypic expression of the FMR1 gene mutation. *J Med Genet*, 32(10), 764-9.
- DEVYS, D., LUTZ, Y., ROUYER, N., BELLOCQ, J. P. & MANDEL, J. L. 1993. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet*, 4(4), 335-40.
- DI MARINO, D., ACHSEL, T., LACOUX, C., FALCONI, M. & BAGNI, C. 2014. Molecular dynamics simulations show how the FMRP Ile304Asn mutation destabilizes the KH2 domain structure and affects its function. *J Biomol Struct Dyn*, 32(3), 337-50.
- DONG, B., HOROWITZ, D. S., KOBAYASHI, R. & KRAINER, A. R. 1993. Purification and cDNA cloning of HeLa cell p54nrb, a nuclear protein with two RNA recognition motifs and extensive homology to human splicing factor PSF and *Drosophila* NONA/BJ6. *Nucleic Acids Res*, 21(17), 4085-92.
- DONG, X., SWEET, J., CHALLIS, J. R., BROWN, T. & LYE, S. J. 2007. Transcriptional activity of androgen receptor is modulated by two RNA splicing factors, PSF and p54nrb. *Mol Cell Biol*, 27(13), 4863-75.
- DREYFUSS, G., MATUNIS, M. J., PINOL-ROMA, S. & BURD, C. G. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem*, 62,289-321.
- DUCHANGE, N., PIDOUX, J., CAMUS, E. & SAUVAGET, D. 2000. Alternative splicing in the human interleukin enhancer binding factor 3 (ILF3) gene. *Gene*, 261(2), 345-53.
- DZIEMBOWSKA, M., PRETTO, D. I., JANUSZ, A., KACZMAREK, L., LEIGH, M. J., GABRIEL, N., DURBIN-JOHNSON, B., HAGERMAN, R. J. & TASSONE, F. 2013. High MMP-9 activity levels in fragile X syndrome are lowered by minocycline. *Am J Med Genet A*, 161a(8), 1897-903.
- EBERHART, D. E., MALTER, H. E., FENG, Y. & WARREN, S. T. 1996. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet*, 5(8), 1083-91.
- EICHLER, E. E., RICHARDS, S., GIBBS, R. A. & NELSON, D. L. 1993. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet*, 2(8), 1147-53.

- EINFELD, S. L., TONGE, B. J. & FLORIO, T. 1994. Behavioural and emotional disturbance in fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, 51(4), 386-91.
- FENG, Y., ABSHER, D., EBERHART, D. E., BROWN, V., MALTER, H. E. & WARREN, S. T. 1997a. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell*, 1(1), 109-18.
- FENG, Y., GUTEKUNST, C. A., EBERHART, D. E., YI, H., WARREN, S. T. & HERSCH, S. M. 1997b. Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci*, 17(5), 1539-47.
- FERNANDEZ, E., RAJAN, N. & BAGNI, C. 2013. The FMRP regulon: from targets to disease convergence. *Front Neurosci*, 7, 191.
- FERRARI, F., MERCALDO, V., PICCOLI, G., SALA, C., CANNATA, S., ACHSEL, T. & BAGNI, C. 2007. The fragile X mental retardation protein-RNP granules show an mGluR-dependent localization in the post-synaptic spines. *Mol Cell Neurosci*, 34(3), 343-54.
- FU, Y. H., KUHL, D. P., PIZZUTI, A., PIERETTI, M., SUTCLIFFE, J. S., RICHARDS, S., VERKERK, A. J., HOLDEN, J. J., FENWICK, R. G., JR., WARREN, S. T. & ET AL. 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 67(6), 1047-58.
- FUJIMURA, K., KANO, F. & MURATA, M. 2008. Identification of PCBP2, a facilitator of IRES-mediated translation, as a novel constituent of stress granules and processing bodies. *Rna*, 14(3), 425-31.
- FUJIMURA, K., KATAHIRA, J., KANO, F., YONEDA, Y. & MURATA, M. 2009. Selective localization of PCBP2 to cytoplasmic processing bodies. *Biochim Biophys Acta*, 1793(5), 878-87.
- GARBER, K. B., VISOOTSAK, J. & WARREN, S. T. 2008. Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet*, 16(6), 666-72.
- GEBAUER, F. & HENTZE, M. W. 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10), 827-35.
- GEDEON, A. K., BAKER, E., ROBINSON, H., PARTINGTON, M. W., GROSS, B., MANCA, A., KORN, B., POUSTKA, A., YU, S., SUTHERLAND, G. R. & ET AL. 1992. Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nat Genet*, 1(5), 341-4.
- GODBOUT, R. & SQUIRE, J. 1993. Amplification of a DEAD box protein gene in retinoblastoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(16), 7578-82.
- GOTTLIEB, T. M. & JACKSON, S. P. 1993. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72(1), 131-42.
- HAGERMAN, R. C. & CEULEMANS, B. 2016. A Controlled, Double-blind, Crossover Trial of Ganaxolone in Children With Fragile X Syndrom. (Online im Internet.) URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01725152> (Stand: 21.07.2016, 16:30).

- HAGERMAN, R. J., VAN HOUSEN, K., SMITH, A. C. & MCGAVRAN, L. 1984. Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, 17(1), 111-21.
- HARRISON, C. J., JACK, E. M., ALLEN, T. D. & HARRIS, R. 1983. The fragile X: a scanning electron microscope study. *J Med Genet*, 20(4), 280-5.
- HEULENS, I., SUTTIE, M., POSTNOV, A., DE CLERCK, N., PERROTTA, C. S., MATTINA, T., FARAVELLI, F., FORZANO, F., KOOY, R. F. & HAMMOND, P. 2013. Craniofacial characteristics of fragile X syndrome in mouse and man. *Eur J Hum Genet*, 21(8), 816-23.
- HINDS, H. L., ASHLEY, C. T., SUTCLIFFE, J. S., NELSON, D. L., WARREN, S. T., HOUSMAN, D. E. & SCHALLING, M. 1993. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet*, 3(1), 36-43.
- HUBER, K. M., KAYSER, M. S. & BEAR, M. F. 2000. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science*, 288(5469), 1254-7.
- HUBER, K. M., GALLAGHER, S. M., WARREN, S. T. & BEAR, M. F. 2002. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7746-50.
- HUNTER, J., RIVERO-ARIAS, O., ANGELOV, A., KIM, E., FOTHERINGHAM, I. & LEAL, J. 2014. Epidemiology of fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164(7), 1648-1658.
- KANAI, Y., DOHMAE, N. & HIROKAWA, N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, 43(4), 513-25.
- KHANDJIAN, E. W., FORTIN, A., THIBODEAU, A., TREMBLAY, S., COTE, F., DEVYS, D., MANDEL, J. L. & ROUSSEAU, F. 1995. A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. *Hum Mol Genet*, 4(5), 783-9.
- KHANDJIAN, E. W., CORBIN, F., WOERLY, S. & ROUSSEAU, F. 1996. The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat Genet*, 12(1), 91-3.
- KILEDJIAN, M. & DREYFUSS, G. 1992. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J*, 11(7), 2655-64.
- KIM, D. H., LANGLOIS, M. A., LEE, K. B., RIGGS, A. D., PUYMIRAT, J. & ROSSI, J. J. 2005. HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence. *Nucleic Acids Res*, 33(12), 3866-74.
- KIRCHGESSNER, C. U., WARREN, S. T. & WILLARD, H. F. 1995. X inactivation of the FMR1 fragile X mental retardation gene. *J Med Genet*, 32(12), 925-9.
- KLINGE, S., VOIGTS-HOFFMANN, F., LEIBUNDGUT, M. & BAN, N. 2012. Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(5), 189-198.

- LAGGERBAUER, B., OSTARECK, D., KEIDEL, E. M., OSTARECK-LEDERER, A. & FISCHER, U. 2001. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet*, 10(4), 329-38.
- LEIGH, M. J., NGUYEN, D. V., MU, Y., WINARNI, T. I., SCHNEIDER, A., CHECHI, T., POLUSSA, J., DOUCET, P., TASSONE, F., RIVERA, S. M., HESSL, D. & HAGERMAN, R. J. 2013. A randomized double-blind, placebo-controlled trial of minocycline in children and adolescents with fragile x syndrome. *J Dev Behav Pediatr*, 34(3), 147-55.
- LINDER, B., PLOTTNER, O., KROISS, M., HARTMANN, E., LAGGERBAUER, B., MEISTER, G., KEIDEL, E. & FISCHER, U. 2008. Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP. *Hum Mol Genet*, 17(20), 3236-46.
- LINDER, P., LASKO, P. F., ASHBURNER, M., LEROY, P., NIELSEN, P. J., NISHI, K., SCHNIER, J. & SLONIMSKI, P. P. 1989. Birth of the D-E-A-D box. *Nature*, 337(6203), 121-2.
- LU, R., WANG, H., LIANG, Z., KU, L., O'DONNELL W, T., LI, W., WARREN, S. T. & FENG, Y. 2004. The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(42), 15201-6.
- LUBS, H. A. 1969. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet*, 21(3), 231-44.
- MARTIN, J. P. & BELL, J. 1943. A PEDIGREE OF MENTAL DEFECT SHOWING SEX-LINKAGE. *Journal of Neurology and Psychiatry*, 6(3-4), 154-157.
- MARTIN, S. J., GRIMWOOD, P. D. & MORRIS, R. G. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci*, 23,649-711.
- MICHALON, A., SIDOROV, M., BALLARD, T. M., OZMEN, L., SPOOREN, W., WETTSTEIN, J. G., JAESCHKE, G., BEAR, M. F. & LINDEMANN, L. 2012. Chronic pharmacological mGlu5 inhibition corrects fragile X in adult mice. *Neuron*, 74(1), 49-56.
- MILLER, D. L. & WEISSBACH, H. 1977. Factors Involved in the Transfer of Aminoacyl-tRNA to the Ribosome. In: WEISSBACH, H. (eds.) *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis*. New York, Academic Press. 323-373.
- MILLER, L. C., BLANDFORD, V., MCADAM, R., SANCHEZ-CARBENTE, M. R., BADEAUX, F., DESGROSEILLERS, L. & SOSSIN, W. S. 2009. Combinations of DEAD box proteins distinguish distinct types of RNA: Protein complexes in neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 40(4), 485-495.
- MUSCO, G., STIER, G., JOSEPH, C., CASTIGLIONE MORELLI, M. A., NILGES, M., GIBSON, T. J. & PASTORE, A. 1996. Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*, 85(2), 237-45.
- NAKADAI, T., FUKUDA, A., SHIMADA, M., NISHIMURA, K. & HISATAKE, K. 2015. The RNA binding complexes NF45-NF90 and NF45-NF110 associate dynamically with the c-fos gene and function as transcriptional coactivators. *J Biol Chem*, 290(44), 26832-45.

- NAPOLI, I., MERCALDO, V., BOYL, P. P., ELEUTERI, B., ZALFA, F., DE RUBEIS, S., DI MARINO, D., MOHR, E., MASSIMI, M., FALCONI, M., WITKE, W., COSTA-MATTIOLI, M., SONENBERG, N., ACHSEL, T. & BAGNI, C. 2008. The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell*, 134(6), 1042-54.
- OBERLE, I., ROUSSEAU, F., HEITZ, D., KRETZ, C., DEVYS, D., HANAUER, A., BOUE, J., BERTHEAS, M. F. & MANDEL, J. L. 1991. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*, 252(5009), 1097-102.
- PARIBELLO, C., TAO, L., FOLINO, A., BERRY-KRAVIS, E., TRANFAGLIA, M., ETHELL, I. M. & ETHELL, D. W. 2010. Open-label add-on treatment trial of minocycline in fragile X syndrome. *BMC Neurol*, 10,91.
- PARK, Y., LEE, J. M., HWANG, M. Y., SON, G. H. & GEUM, D. 2013. NonO binds to the CpG island of oct4 promoter and functions as a transcriptional activator of oct4 gene expression. *Mol Cells*, 35(1), 61-9.
- PATEL, R. C., VESTAL, D. J., XU, Z., BANDYOPADHYAY, S., GUO, W., ERME, S. M., WILLIAMS, B. R. & SEN, G. C. 1999. DRBP76, a double-stranded RNA-binding nuclear protein, is phosphorylated by the interferon-induced protein kinase, PKR. *J Biol Chem*, 274(29), 20432-7.
- PAUL, S., DANSITHONG, W., KIM, D., ROSSI, J., WEBSTER, N. J., COMAI, L. & REDDY, S. 2006. Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *Embo j*, 25(18), 4271-83.
- PEMBREY, M. E., WINTER, R. M. & DAVIES, K. E. 1985. A premutation that generates a defect at crossing over explains the inheritance of fragile X mental retardation. *Am J Med Genet*, 21(4), 709-17.
- PEREZ-GONZALEZ, A., PAZO, A., NAVAJAS, R., CIORDIA, S., RODRIGUEZ-FRANDSEN, A. & NIETO, A. 2014. hCLE/C14orf166 associates with DDX1-HSPC117-FAM98B in a novel transcription-dependent shuttling RNA-transporting complex. *PLoS One*, 9(3), e90957.
- PFEIFER, I., ELSBY, R., FERNANDEZ, M., FARIA, P. A., NUSSENZVEIG, D. R., LOSSOS, I. S., FONTOURA, B. M., MARTIN, W. D. & BARBER, G. N. 2008. NFAR-1 and -2 modulate translation and are required for efficient host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(11), 4173-8.
- PIERETTI, M., ZHANG, F. P., FU, Y. H., WARREN, S. T., OOSTRA, B. A., CASKEY, C. T. & NELSON, D. L. 1991. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*, 66(4), 817-22.
- PRICE, D. K., ZHANG, F., ASHLEY, C. T., JR. & WARREN, S. T. 1996. The chicken FMR1 gene is highly conserved with a CCT 5'-untranslated repeat and encodes an RNA-binding protein. *Genomics*, 31(1), 3-12.
- PRICE, J., ROBERTS, J., VANDERGRIFT, N. & MARTIN, G. 2007. Language comprehension in boys with fragile X syndrome and boys with Down syndrome. *J Intellect Disabil Res*, 51(Pt 4), 318-26.

- RAMOS, A., HOLLINGWORTH, D., ADINOLFI, S., CASTETS, M., KELLY, G., FRENKIEL, T. A., BARDONI, B. & PASTORE, A. 2006. The structure of the N-terminal domain of the fragile X mental retardation protein: a platform for protein-protein interaction. *Structure*, 14(1), 21-31.
- REICHMAN, T. W. & MATHEWS, M. B. 2003. RNA binding and intramolecular interactions modulate the regulation of gene expression by nuclear factor 110. *Rna*, 9(5), 543-54.
- REICHMAN, T. W., MUNIZ, L. C. & MATHEWS, M. B. 2002. The RNA binding protein nuclear factor 90 functions as both a positive and negative regulator of gene expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 22(1), 343-56.
- REICHMAN, T. W., PARROTT, A. M., FIERRO-MONTI, I., CARON, D. J., KAO, P. N., LEE, C. G., LI, H. & MATHEWS, M. B. 2003. Selective regulation of gene expression by nuclear factor 110, a member of the NF90 family of double-stranded RNA-binding proteins. *J Mol Biol*, 332(1), 85-98.
- REISS, A. L., FREUND, L. S., BAUMGARDNER, T. L., ABRAMS, M. T. & DENCKLA, M. B. 1995. Contribution of the FMR1 gene mutation to human intellectual dysfunction. *Nat Genet*, 11(3), 331-4.
- ROBLEDO, S., IDOL, R. A., CRIMMINS, D. L., LADENSON, J. H., MASON, P. J. & BESSLER, M. 2008. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *Rna*, 14(9), 1918-29.
- ROUSSEAU, F., HEITZ, D., BIANCALANA, V., BLUMENFELD, S., KRETZ, C., BOUE, J., TOMMERUP, N., VAN DER HAGEN, C., DELOZIER-BLANCHET, C., CROQUETTE, M. F. & ET AL. 1991. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med*, 325(24), 1673-81.
- RUVINSKY, I., SHARON, N., LERER, T., COHEN, H., STOLOVICH-RAIN, M., NIR, T., DOR, Y., ZISMAN, P. & MEYUHAS, O. 2005. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev*, 19(18), 2199-211.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. A8.40-A8.51, 5.4-5.13.
- SCHARF, S. H., JAESCHKE, G., WETTSTEIN, J. G. & LINDEMANN, L. 2015. Metabotropic glutamate receptor 5 as drug target for Fragile X syndrome. *Curr Opin Pharmacol*, 20,124-34.
- SCHENCK, A., BARDONI, B., MORO, A., BAGNI, C. & MANDEL, J. L. 2001. A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(15), 8844-9.
- SCHRIER, M., SEVERIJNEN, L. A., REIS, S., RIFE, M., VAN'T PADJE, S., VAN CAPPELLEN, G., OOSTRA, B. A. & WILLEMSSEN, R. 2004. Transport kinetics of FMRP containing the I304N mutation of severe fragile X syndrome in neurites of living rat PC12 cells. *Exp Neurol*, 189(2), 343-53.

- SCHWEMMLE, S., DE GRAAFF, E., DEISSLER, H., GLASER, D., WOHRLE, D., KENNERKNECHT, I., JUST, W., OOSTRA, B. A., DOERFLER, W., VOGEL, W. & STEINBACH, P. 1997. Characterization of FMR1 promoter elements by in vivo-footprinting analysis. *Am J Hum Genet*, 60(6), 1354-62.
- SHERMAN, S. L., MORTON, N. E., JACOBS, P. A. & TURNER, G. 1984. The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet*, 48(Pt 1), 21-37.
- SHERMAN, S. L., JACOBS, P. A., MORTON, N. E., FROSTER-ISKENIUS, U., HOWARD-PEEBLES, P. N., NIELSEN, K. B., PARTINGTON, M. W., SUTHERLAND, G. R., TURNER, G. & WATSON, M. 1985. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet*, 69(4), 289-99.
- SHIM, J., LIM, H., J, R. Y. & KARIN, M. 2002. Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization. *Mol Cell*, 10(6), 1331-44.
- SIOMI, H., SIOMI, M. C., NUSSBAUM, R. L. & DREYFUSS, G. 1993. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell*, 74(2), 291-8.
- SIOMI, H., CHOI, M., SIOMI, M. C., NUSSBAUM, R. L. & DREYFUSS, G. 1994. Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell*, 77(1), 33-9.
- SIOMI, M. C., SIOMI, H., SAUER, W. H., SRINIVASAN, S., NUSSBAUM, R. L. & DREYFUSS, G. 1995. FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J*, 14(11), 2401-8.
- SITTLER, A., DEVYS, D., WEBER, C. & MANDEL, J. L. 1996. Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. *Hum Mol Genet*, 5(1), 95-102.
- SNYDER, E. M., PHILPOT, B. D., HUBER, K. M., DONG, X., FALLON, J. R. & BEAR, M. F. 2001. Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nat Neurosci*, 4(11), 1079-85.
- SREERAM, N., WREN, C., BHATE, M., ROBERTSON, P. & HUNTER, S. 1989. Cardiac abnormalities in the fragile X syndrome. *Br Heart J*, 61(3), 289-91.
- SUNG, Y. J., DOLZHANSKAYA, N., NOLIN, S. L., BROWN, T., CURRIE, J. R. & DENMAN, R. B. 2003. The fragile X mental retardation protein FMRP binds elongation factor 1A mRNA and negatively regulates its translation in vivo. *J Biol Chem*, 278(18), 15669-78.
- SUTCLIFFE, J. S., NELSON, D. L., ZHANG, F., PIERETTI, M., CASKEY, C. T., SAXE, D. & WARREN, S. T. 1992. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, 1(6), 397-400.
- SUTHERLAND, G. R. 1977. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*, 197(4300), 265-6.

- TABOLACCI, E., DE PASCALIS, I., ACCADIA, M., TERRACCIANO, A., MOSCATO, U., CHIURAZZI, P. & NERI, G. 2008. Modest reactivation of the mutant FMR1 gene by valproic acid is accompanied by histone modifications but not DNA demethylation. *Pharmacogenet Genomics*, 18(8), 738-41.
- TAMANINI, F., WILLEMSSEN, R., VAN UNEN, L., BONTEKOE, C., GALJAARD, H., OOSTRA, B. A. & HOOGEVEEN, A. T. 1997. Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. *Hum Mol Genet*, 6(8), 1315-22.
- TANNER, N. K. & LINDER, P. 2001. DExD/H Box RNA Helicases: From Generic Motors to Specific Dissociation Functions. *Molecular Cell*, 8(2), 251-262.
- THAKUR, S., NAKAMURA, T., CALIN, G., RUSSO, A., TAMBURRINO, J. F., SHIMIZU, M., BALDASSARRE, G., BATTISTA, S., FUSCO, A., WASSELL, R. P., DUBOIS, G., ALDER, H. & CROCE, C. M. 2003. Regulation of BRCA1 transcription by specific single-stranded DNA binding factors. *Mol Cell Biol*, 23(11), 3774-87.
- TORRIOLI, M. G., VERNACOTOLA, S., PERUZZI, L., TABOLACCI, E., MILA, M., MILITERNI, R., MUSUMECI, S., RAMOS, F. J., FRONTERA, M., SORGE, G., MARZULLO, E., ROMEO, G., VALLEE, L., VENESELLI, E., COCCHI, E., GARBARINO, E., MOSCATO, U., CHIURAZZI, P., D'IDDIO, S., CALVANI, M. & NERI, G. 2008. A double-blind, parallel, multicenter comparison of L-acetylcarnitine with placebo on the attention deficit hyperactivity disorder in fragile X syndrome boys. *Am J Med Genet A*, 146a(7), 803-12.
- TURNER, G., DANIEL, A. & FROST, M. 1980. X-linked mental retardation, macroorchidism, and the Xq27 fragile site. *J Pediatr*, 96(5), 837-41.
- VANDERKLISH, P. W. & EDELMAN, G. M. 2002. Dendritic spines elongate after stimulation of group 1 metabotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(3), 1639-44.
- VERKERK, A. J., PIERETTI, M., SUTCLIFFE, J. S., FU, Y. H., KUHLE, D. P., PIZZUTI, A., REINER, O., RICHARDS, S., VICTORIA, M. F., ZHANG, F. P. & ET AL. 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65(5), 905-14.
- VERKERK, A. J., DE GRAAFF, E., DE BOULLE, K., EICHLER, E. E., KONECKI, D. S., REYNIERS, E., MANCA, A., POUSTKA, A., WILLEMS, P. J., NELSON, D. L. & ET AL. 1993. Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet*, 2(4), 399-404.
- WALHOUT, A. J., TEMPLE, G. F., BRASCH, M. A., HARTLEY, J. L., LORSON, M. A., VAN DEN HEUVEL, S. & VIDAL, M. 2000. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol*, 328, 575-92.
- WILSON, D. N. & DOUDNA CATE, J. H. 2012. The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(5).

- WOHRLE, D., KOTZOT, D., HIRST, M. C., MANCA, A., KORN, B., SCHMIDT, A., BARBI, G., ROTT, H. D., POUSTKA, A., DAVIES, K. E. & ET AL. 1992. A microdeletion of less than 250 kb, including the proximal part of the FMR-I gene and the fragile-X site, in a male with the clinical phenotype of fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet*, 51(2), 299-306.
- WRIGHT-TALAMANTE, C., CHEEMA, A., RIDDLE, J. E., LUCKEY, D. W., TAYLOR, A. K. & HAGERMAN, R. J. 1996. A controlled study of longitudinal IQ changes in females and males with fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, 64(2), 350-5.
- YANG, Y. S., HANKE, J. H., CARAYANNOPOULOS, L., CRAFT, C. M., CAPRA, J. D. & TUCKER, P. W. 1993. NonO, a non-POU-domain-containing, octamer-binding protein, is the mammalian homolog of *Drosophila* nonAdiss. *Mol Cell Biol*, 13(9), 5593-603.
- ZALFA, F., ACHSEL, T. & BAGNI, C. 2006. mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol*, 16(3), 265-9.
- ZALFA, F., ELEUTERI, B., DICKSON, K. S., MERCALDO, V., DE RUBEIS, S., DI PENTA, A., TABOLACCI, E., CHIURAZZI, P., NERI, G., GRANT, S. G. N. & BAGNI, C. 2007. A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. *Nat Neurosci*, 10(5), 578-587.
- ZHANG, Y., O'CONNOR, J. P., SIOMI, M. C., SRINIVASAN, S., DUTRA, A., NUSSBAUM, R. L. & DREYFUSS, G. 1995. The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J*, 14(21), 5358-66.
- ZHANG, Z. & CARMICHAEL, G. G. 2001. The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell*, 106(4), 465-75.

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Stefan Kindler für die fachliche Anleitung und die freundliche und engagierte Betreuung meiner Dissertation.

Danken möchte ich auch der gesamten AG Kindler für die Hilfestellung bei praktischen Laborfragen und die gute Zusammenarbeit.

Ein herzlicher Dank meinen Eltern, für ihre stets liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen.

9 Lebenslauf

Entfällt aus Gründen des Datenschutzes

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: Anna Egbers 17.08.2016